

SÉRIE A, N° 3320

N° D'ORDRE :
4192

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

MARIANNE GAJDOS-TÖRÖK

1^{re} THÈSE. — CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA BIOSYNTHÈSE DE
L'HÈME.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le **2 DEC 1959** devant la Commission d'examen

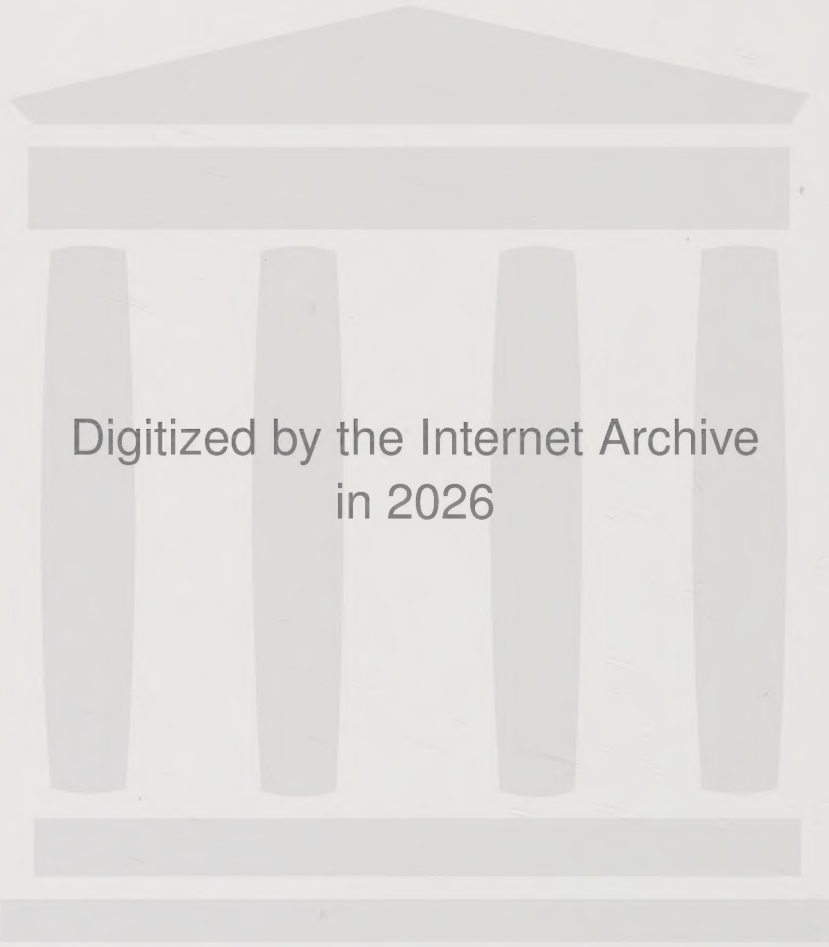
M. MONNIER..... *Président.*

M^{lle} LE BRETON.... } *Examineurs.*
M. STOLKOVSKY... }

MASSON ET C^{ie} ÉDITEURS

LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE
120, BOULEVARD SAINT-GERMAIN, PARIS, VI^e

1959



Digitized by the Internet Archive
in 2026

SÉRIE A, N° 3320

N° D'ORDRE :
4192

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

MARIANNE GAJDOS-TÖRÖK

1^{re} THÈSE. — CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA BIOSYNTHESE DE
L'HÈME.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le

devant la Commission d'examen

M. MONNIER..... *Président.*

M^{lle} LE BRETON.... }
M. STOLKOVSKY... } *Examineurs.*



MASSON ET C^{ie} ÉDITEURS

LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE
120, BOULEVARD SAINT-GERMAIN, PARIS, VI^e

1959

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

Doyen..... J. PÉRÈS

PROFESSEURS

G. JULIA.....	T	Analyse sup. et Algèbre sup.	BRELOT.....	T	Calcul différentiel.
FOCH.....	T	Mécan. phys. et expériment.	NORMANT.....	T	Chimie organique.
DE BROGLIE.....	T	Théories physiques.	BENARD.....	T	Chimie minérale.
PRENANT.....	T	Anatomie et Histol. comp.	BUVAT.....	T	Botanique (E.N.S.).
PERES.....	T	Mécan. des Fluides et appl.	DUGUÉ.....	T	Statistiques mathéma.
M. CURIE.....	T	Physique (S.P.C.N.).	GELOSO.....	T	Chimie (S.P.C.N.).
BARRABÉ.....	T	Géol. struct. et Géol. appl.	SOULAIRAC.....	T	Psychophysiologie.
J. BOURCART.....	T	Géogr. phys. et Géol. dynam.	ULRICH.....	T	Physiologie végétale.
PLANTEFOL.....	T	Botanique.	MARÉCHAL.....	T	Optique théorique et appli- quée.
GRASSÉ.....	T	Évolution des êtres organisés.	KIRRMANN.....	T	Théories chimiques.
PRÉVOST.....	T	Chimie organique.	CHADEFAUD.....	T	Botanique.
BOULIGAND.....	T	Application de l'analyse à la Géométrie.	DESTRIAU.....	T	Physique (M.P.C.).
CHAUDRON.....	T	Chimie appliquée.	M ^{lle} LE BRETON.....	T	Physiologie générale.
WYART.....	T	Minéralogie.	SALEM.....	T	Mathématiques générales.
TEISSIER.....	T	Zoologie.	LELONG.....	T	Mathématiques générales.
MANGENOT.....	T	Biologie végétale.	DEVILLERS.....	T	Anatom. et Histol. comparées.
P. AUGER.....	T	Physique quantique et relativité.	EHRESMANN.....	T	Topologie algébrique.
MONNIER.....	T	Physiologie générale.	FRANCON.....	T	Physique (S.P.C.N.).
PIVETEAU.....	T	Paléontologie.	GLANGEAUD.....	T	Géogr. phys. et Géol. dyn.
ROCARD.....	T	Physique (E.N.S.).	GODEMENT.....	T	Mathématiques (M.P.C.).
H. CARTAN.....	T	Mathématiques (E.N.S.).	PISOT.....	T	Calcul des Probabilités.
LAFFITTE.....	T	Chimie générale.	ROCH E.....	T	Géologie.
FAYARD.....	T	Géométrie supérieure.	SCHATZMANN.....	T	Astrophysique.
COULOMB.....	T	Physique du Globe.	TERMIER.....	T	Paléontologie stratigraphique.
M ^{lle} COUSIN.....	T	Biologie animale (S.P.C.N.).	ZAMANSKY.....	T	Mathématiques générales.
CHRÉTIEN.....	T	Chimie minérale.	LENNUIER.....	T	Physique (M.G.P.).
P. DRACH.....	T	Zoologie.	RIZET.....	T	Génétique.
KASTLER.....	T	Physique (E.N.S.).	ROUTHIER.....	T	Géologie appliquée.
EPHROSSI.....	T	Génétique.	M ^{me} TONNELAT.....	T	Théories physiques.
WURMSER.....	T	Biologie physico-chimique.	DIXMIER.....	T	Mathématiques (M.P.C.).
RIVIÈRE.....	T	Géologie (S.P.C.N.).	SOUCHAY.....	T	Chimie générale.
GAUTHERET.....	T	Biologie végétale (P.C.B.).	AIGRAIN.....	T	Électrotechnique.
LUCAS.....	T	Recherches physiques.	BRUSSET.....	T	Chimie minérale.
A. THOMAS.....	T	Biologie cellulaire.	M. LEVY.....	T	Physique théorique.
ARNULF.....	T	Optique appliquée.	M ^{me} CHAIX.....	T	Chimie biologique.
M. MORAND.....	T	Enseignement de Physique.	M ^{me} HUREL-PY.....	T	Biologie végétale (P.C.B.).
SOLEILLET.....	T	Physique.	PIAUX.....	T	Chimie (P.C.B.).
FORTIER.....	T	Mécanique expérimentale des fluides.	BRUN.....	T	Mécan. expérim. des fluides.
DANJON.....	T	Astronomie.	LEDERER.....	T	Chimie des substances orga- niques naturelles.
LAPORTE.....	T	Physique générale et Radio- activité.	M ^{me} DUBREIL.....	T	Mathématiques.
JANET.....	T	Mécan. anal. et Méc. céleste.	M ^{me} LELONG.....	T	Mathématiques (E.N.S.).
PETIT.....	T	Biologie maritime.	BELLAIR.....	T	Géologie (S.P.C.N.).
QUENEY.....	T	Météor. et dynam. atmosph.	COTTE.....	T	Physique (M.P.C.).
GALLIEN.....	T	Embryologie.	DUBOIS J. E.....	T	Chimie (S.P.C.N.).
EICHHORN.....	T	Biologie végétale (S.P.C.N.).	LAMOTTE.....	T	Zoologie (E.N.S.).
DE CUGNAC.....	T	Biologie végétale (S.P.C.N.).	MICHEL André.....	T	Chimie (S.P.C.N.).
M ^{lle} CAUCHOIS.....	T	Chimie physique.	OLMER.....	T	Énergétique générale.
THELLIER.....	T	Physique du Globe.	ROUAULT.....	T	Physique générale.
L'HÉRITIER.....	T	Génétique.	GAUTHIER.....	T	Mécanique appliquée.
GRIVET.....	T	Radioélectricité.	BARCHEWITZ.....	T	Chimie physique.
PONCIN.....	T	Mécanique générale.	BROSSEL.....	T	Physique atomique.
DUBREIL.....	T	Arith. et théorie des nombres.	BUSER.....	T	Biologie animale (P.C.B.).
QUELET.....	T	Chimie organique.	CAMUS.....	T	Biologie végétale (P.C.B.).
CAGNIARD.....	T	Géophysique appliquée.	CASTAING.....	T	Physique générale.
CHAMPETIER.....	T	Chimie macromoléculaire.	CURIEN.....	T	Minéralogie et cristallogra- phie.
CUVILLIER.....	T	Géol. struct. et Géol. appl.	MOYSE.....	T	Physiologie végétale.
JUNG.....	T	Pétrographie.	NOIROT.....	T	Évolution des Êtres orga- nisés.
TRILLAT.....	T	Microsc. et Diffr. électron.	PANNETIER.....	T	Chimie (S.P.C.N.).
WIEMANN.....	T	Chimie organique. et structu- rale.	POSSOMPES.....	T	Biologie animale (P.C.B.).
JACQUINOT.....	T	Spectroscopie et Phys. céleste	PULLMANN.....	T	Chimie théorique.
VASSY.....	T	Physique de l'atmosphère.	TEILLAC.....	T	Physique nucl. et Radioactiv.
DESTOUCHES.....	T	Théories physiques.	TONNELAT.....	T	Biologie physico-chimique.
M. PRUVOST.....	T	Géologie.	VILE.....	T	Économétrie.
AMIEL.....	T	Chimie générale (P.C.B.).	WILLEMART.....	T	Chimie (P.C.B.).
HOCART.....	T	Minéralogie.	DODÉ.....	T	Chimie.
J. P. MATHIEU.....	T	Physique (P.C.B.).	FREYMANN.....	T	Physique (S.P.C.N.).
COUTEAUX.....	T	Biologie animale (P.C.B.).	GUINOCHE.....	T	Biologie végétale (Orsay).
MAY.....	T	Biologie animale (P.C.B.).	ROLLET.....	T	Chimie (P.C.B.).
CHOQUET.....	T	Calcul différentiel et intégral.	M ^{lle} JOSIEN.....	T	Chimie (P.C.B.).
FELDMANN.....	T	Biologie (P.C.B.).	CHEVALLEY.....	T	Géométrie algébrique et théo- rie des groupes.
GUINIER.....	T	Physique des solides.	ARNOULT.....	T	Physique (Orsay).
JOST.....	T	Physiologie comparée.	CHAPELLE.....	T	Physique (P.C.B.).
FORTET.....	T	Calcul des probabilités.	DELANGE.....	T	Mathématiques (Orsay).
SCHWARTZ.....	T	Calcul différentiel et intégral.	DENY.....	T	Mathématiques (Orsay).
CHOUARD.....	T	Physiologie végétale.	GERMAIN.....	T	Mécanique théor. des fluides.
MALAVARD.....	T	Aviation.	LUCAS G.....	T	Géologie.

Secrétaire général..... C. MONIER

A M. le professeur LOUIS BUGNARD, directeur de l'Institut National d'Hygiène, à qui nous devons d'avoir pu nous consacrer à la Recherche, en témoignage de notre reconnaissance.

A M. le professeur HENRI BÉNARD, secrétaire perpétuel de l'Académie de Médecine, qui a bien voulu guider notre travail et dont les conseils éclairés nous ont quotidiennement aidé. Qu'il veuille trouver ici l'expression de notre profonde gratitude.

A M. MAURICE BARIÉTY, professeur à la Clinique Médicale de l'Hôtel-Dieu, qui a bien voulu nous accueillir dans son laboratoire de Recherche, avec notre très grande reconnaissance.

A M. le professeur A. MONNIER, qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de cette thèse et a encouragé nos travaux avec tant de bienveillance.

A M^{lle} le professeur E. LE BRETON qui a bien voulu accepter de faire partie de notre jury.

A M. J. STOLKOWSKI dont les conseils nous ont été si précieux.

A Michel POLONOVSKI

In Memoriam

A MON MARI

A TOUS LES MIENS

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA BIOSYNTHÈSE DE L'HÈME

PAR

Mme Marianne GAJDOS-TÖRÖK

(Laboratoire de recherches de la Clinique Médicale de l'Hôtel-Dieu
et de l'Académie de Médecine.)

SOMMAIRE

INTRODUCTION	2
RÉSUMÉ DE NOS CONNAISSANCES ACTUELLES SUR LA BIOSYNTHÈSE DE L'HÈME	3
RECHERCHES PERSONNELLES :	
I. — <i>Techniques générales employées aux cours de nos expériences.</i>	18
II. — <i>Étude de la protoporphyrine libre des globules rouges in vivo et in vitro</i>	26
Aptitude de divers organes à réaliser les étapes de la biosynthèse de la protoporphyrine et l'action des effecteurs biochimiques sur ces étapes.	49
Étude du système enzymatique catalysant l'incorporation du fer dans la protoporphyrine	56
III. — <i>Discussion.</i>	59
RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS.	69
BIBLIOGRAPHIE	73

INTRODUCTION

La biosynthèse de l'hème, dès l'introduction de la méthode des isotopes dans ce domaine en 1945, a été l'objet des travaux biochimiques ininterrompus jusqu'à nos jours dans une dizaine de laboratoires spécialisés. Ces recherches ont permis d'élucider en grande partie la biosynthèse de l'hème avec ses multiples étapes intermédiaires, avec ses différents systèmes enzymatiques, avec ses nombreux effecteurs biologiques.

Nos propres travaux poursuivis pendant ce même laps de temps s'inscrivent dans ce programme général. Nous nous sommes efforcé de les conduire suivant les techniques et les données expérimentales les plus récentes, ce qui nous a permis d'étudier presque tous les problèmes de ce vaste ensemble au fur et à mesure que les découvertes réalisées avaient ouvert de nouvelles possibilités de recherches. Une grande partie de nos expériences confirment les observations d'autres auteurs, mais certaines de nos recherches ont permis, croyons-nous, d'apporter une modeste contribution personnelle.

Pour la clarté de notre exposé, nous avons divisé notre sujet en trois chapitres :

— Le premier résume brièvement nos connaissances actuelles sur la biosynthèse de l'hème sans vouloir épuiser la bibliographie énorme de ce vaste sujet.

— Le deuxième est consacré à la description des techniques que nous avons employées.

— Le dernier chapitre, enfin, réunit nos recherches personnelles. Nous avons préféré à l'ordre chronologique un exposé suivant les étapes biochimiques de la formation de l'hème. Nous nous excusons des répétitions que ce plan nous a forcément imposées (1).

(1) Nous tenons à exprimer notre gratitude à M. le P^r H. BÉNARD, Secrétaire perpétuel de l'Académie de Médecine, qui nous a permis de profiter constamment de ses vastes connaissances biologiques et de ses conseils toujours éclairés. Nous remercions très vivement M. le P^r BARIÉTY, d'avoir mis à notre disposition son laboratoire de recherche à la Clinique Médicale de l'Hôtel-Dieu. Que les professeurs C. RIMINGTON et A. NEUBERGER trouvent ici également l'expression de notre reconnaissance pour l'aimable accueil qu'ils nous ont réservé dans leurs laboratoires à Londres, où nous avons pu nous familiariser avec les techniques les plus modernes et prendre connaissance de leurs recherches en cours.

CHAPITRE PREMIER

RÉSUMÉ DE NOS CONNAISSANCES ACTUELLES
SUR LA BIOSYNTÈSE DE L'HÈME

LES PRÉCURSEURS PRIMITIFS DES PORPHYRINES.

L'étude de la biosynthèse de l'hème ne s'est engagée dans une voie décisive que depuis une dizaine d'années environ. Ce fait ne peut étonner si l'on pense que la synthèse de la protoporphyrine au laboratoire n'a été réalisée par HANS FISCHER qu'il y a moins de vingt ans, synthèse qui a prouvé définitivement l'exactitude de la formule chimique proposée bien plus tôt par le même auteur.

Pendant une longue période, le problème de la biosynthèse de l'hème était l'objet d'hypothèses fragiles, fondées sur des spéculations plus ou moins théoriques sur la possibilité de la cyclisation dans l'organisme de divers métabolites en noyau pyrrolique.

Sur la base expérimentale, THOMAS a étudié, en 1938, le problème chez le Rat et M^{me} BLOCH-RAPHAËL chez les Annélides polychètes en 1939. Ce dernier auteur a observé que chez ces espèces la quantité d'hémoglobine néoformée s'adapte à des variations des conditions physiologiques. THOMAS étudie le mécanisme biochimique de la formation de la protoporphyrine hémoglobinique dans la glande de HARDER de Rat et conclut de ses expériences que « la synthèse du noyau tétrapyrrolique doit s'effectuer à partir de substances très simples n'ayant aucun caractère de spécificité, contrairement à ce qu'on pensait de l'intervention du tryptophane ou d'acides aminés particuliers ».

Mais le problème biochimique de la formation de l'hème dans l'organisme n'est devenu en réalité abordable que par l'emploi des isotopes et dès que cette technique admirable a été mise à la disposition des chercheurs, les découvertes importantes ont été faites dans ce domaine à une cadence rapide.

C'est ainsi qu'entre 1945 et 1948 l'école de RITTENBERG aux États-Unis d'une part, celle de NEUBERGER en Angleterre d'autre part, ont montré aussi bien *in vivo* chez l'Homme et le Lapin, qu'*in vitro* par l'incubation du sang d'Oiseau (Canard, Poulet) ou de sang de Lapin préalablement rendu anémique, que la protoporphyrine hémoglobinique était synthétisée à partir de deux précurseurs très simples, l'acide acétique et le glycolle.

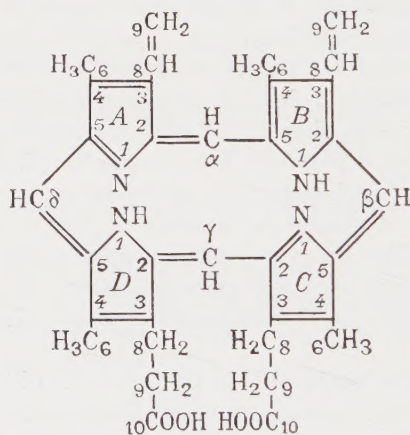
L'emploi de ces précurseurs marqués a permis également d'élucider la provenance exacte de chaque atome de carbone et d'azote de la protoporphyrine hémoglobinique.

Ce travail magnifique est lié surtout au nom de SHEMIN et ses collaborateurs (SHEMIN, LONDON et RITTENBERG, 1948).

Après incubation du sang de Canard avec le glycolle marqué soit par ^{15}N (l'azote lourd), soit par le carbone radioactif (^{14}C) dans son groupement méthylénique, ou bien encore avec l'acide acétique marqué par ^{14}C , soit en position 1, soit en position 2, SHEMIN et ses collaborateurs isolent, en fin d'incubation, la protoporphyrine hémoglobinique sous forme cristallisée. Ils la soumettent ensuite à une dégradation successive permettant d'obtenir des chaînes carbonées de plus en plus courtes. La détermination de la teneur en azote lourd ou en carbone radioactif des fractions ainsi obtenues a permis d'établir que les quatre atomes d'azote protoporphyriniques provenaient du glycolle qui fournissait également huit atomes de carbone, notamment les 4 carbones des ponts méthéniques et les 4 carbones en position 2 des quatre noyaux pyrroliques.

Les 28 atomes restants proviennent de l'acide acétique. Les carbones 4, 6, 8 et 9 de chacun des quatre noyaux pyrroliques tirent leur origine uniquement du groupement méthylique de l'acide acétique. En ce qui concerne les 10 atomes de carbone restants, notamment les 2 carbones carboxyliques et les carbones 3 et 5 des quatre pyrroles, ils ont une origine mixte, où participent, avec une proportion inégale, le groupement méthylénique et le groupement carboxylique de l'acide acétique.

La formule suivante empruntée à SHEMIN et ses collaborateurs résume ces faits :



Protoporphyrine

En ce qui concerne les atomes d'hydrogène de la protoporphyrine, PONTEVORIO et ses collaborateurs (1950) ont montré, à l'aide de l'emploi de l'acide acétique marqué par le deutérium, qu'ils provenaient en très grande partie de cet acide.

On a également constaté que le carbone carboxylique du glycolle ne participait pas à la synthèse de l'hème. Il est utilisé en revanche pour la néoformation de la globine.

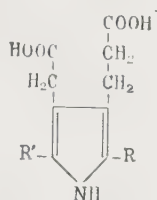
D'autre part, on a remarqué également que 8 molécules de glycolle étaient nécessaires pour la synthèse d'une molécule de protoporphyrine.

Un azote glycollique sur deux est donc inutilisé. Lors de l'emploi de glycolle marqué par l'azote lourd, on a effectivement retrouvé ces atomes d'azote non utilisés sous forme de $^{14}\text{NH}_3$.

FORMATION DU NOYAU MONOPYRROLIQUE PRIMITIF.

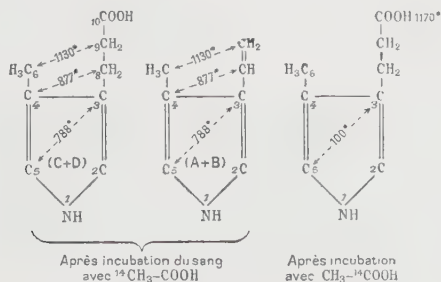
L'étude des produits de dégradation de la protoporphyrine, synthétisée par les globules rouges nucléés ou par les réticulocytes à partir de glycolle marqué par l'azote lourd, a permis d'envisager que la molécule porphyrinique provenait de l'assemblage de 4 molécules d'un même noyau monopyrrolique. Les deux molécules d'acide hématinique et les deux molécules de méthylmaléinimide obtenus à partir de la protoporphyrine, renferment en effet l'azote lourd en quantité identique. Mais l'établissement de la formule exacte de ce noyau monopyrrolique primitif s'est révélé assez laborieux.

SHEMIN, LONDON et RITTENBERG (1950) proposent la formule suivante :



Mais cette formule ne pouvait pas expliquer la perte d'un azote glycollique sur deux. En tenant compte de ce dernier fait, MUIR et NEUBERGER (1950) ont supposé la formation d'un intermédiaire tétracarboné monoaminé résultant de l'union d'une molécule de glycolle avec un produit de désamination de celui-ci : l'acide glyoxylique. Mais si cette proposition pouvait s'appuyer sur certaines observations biochimiques, et notamment sur l'action de la glycolle-désaminase, elle n'était fondée sur aucune preuve directe.

SHEMIN et WITTENBERG (1951) réalisent un pas décisif. Faisant incuber du sang de Canard avec l'acide acétique marqué par ^{14}C , soit dans son groupement carboxylique, soit dans son groupement méthylique, ces auteurs aboutissent, par l'étude de la distribution de la radioactivité de l'hème néoformé, à la conclusion que les deux moitiés du noyau pyrrol primitif, celle qui porte le reste acétique, et celle qui porte le reste propanoïque, proviennent d'un même précurseur.



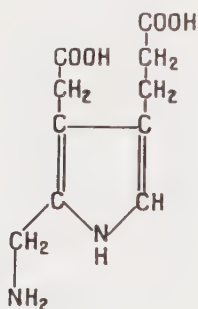
L'identité de la radioactivité des carbones 6 et 9, des pyrroles C et D conduit ces auteurs, d'autre part, à admettre que l'acide acétique s'est transformé par l'intermédiaire du cycle de KREBS en acide succinique, probablement activé par combinaison avec le coenzyme A.

Deux molécules de cet acide succinique activé se combineraient avec le glycolle pour former le noyau monopyrrol primitif.

D'après SHEMIN et KUMIN (1952) l'acide succinique peut s'activer dans le cycle de KREBS soit directement, soit par passage transitoire à l'état d'acide α -cétoglutarique ; la seconde de ces voies peut être bloquée par l'acide malonique. WRISTON, LACK et SHEMIN (1955) ont apporté récemment de nouvelles preuves en faveur de cette manière de voir.

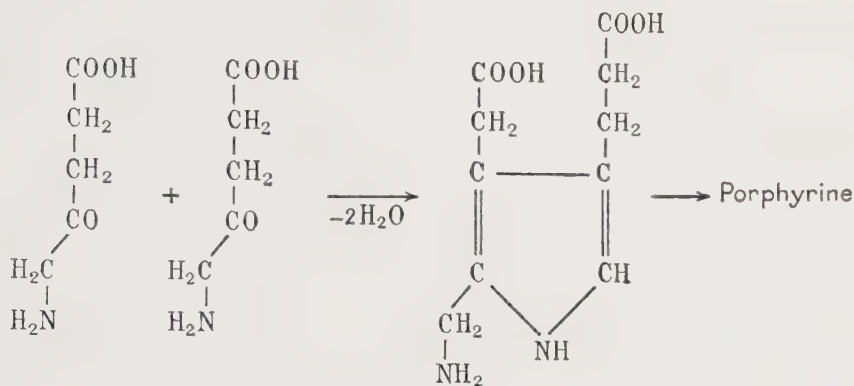
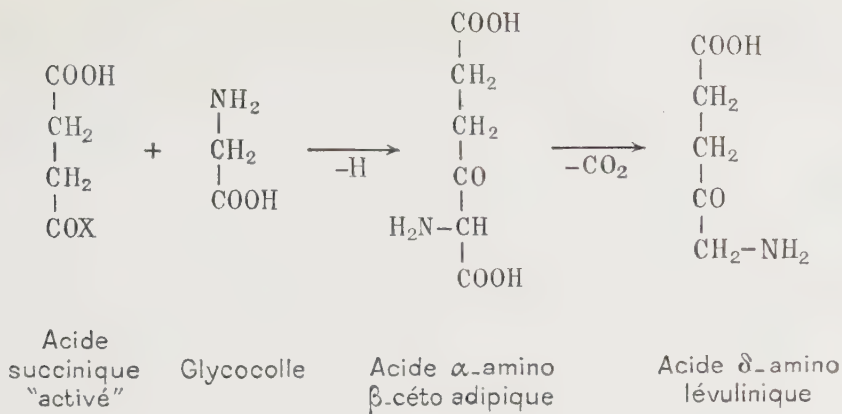
Le rôle de l'acide succinique étant ainsi établi, il restait à préciser son mode de combinaison avec le glycolle, en tenant compte du fait qu'une moitié de l'azote de ce dernier doit être perdue.

Le problème a trouvé par la suite sa solution définitive par une voie indirecte. COOCKSON et RIMINGTON (1953) d'une part, KENNARD (1953) d'autre part, ont établi, que le porphobilinogène, chromogène des prophyrines, qu'on trouve dans les urines de certains sujets atteints de porphyrie idiopathique, était constitué par un seul dérivé monopyrrolique, correspondant à la formule suivante :



Cette formule a suggéré immédiatement à deux groupes de chercheurs différents, celui de SHEMIN aux États-Unis et celui de NEUBERGER à Londres, d'envisager, comme précurseur direct de ce porphobilinogène, l'acide δ -aminolévulinique.

Au cours de la formation de l'acide δ -aminolévulinique, l'acide succinique est activé par le coenzyme A et le glycolle par le phosphate de pyridoxal comme l'ont montré KIKUCHI et ses collaborateurs (1958). L'acide α -cétoglutarique peut remplacer, dans une certaine mesure, l'acide succinique, sans doute par sa transformation en acide succinique. Celui-ci combiné au glycolle activé donne naissance à l'acide α -amino β -cétoadipique, qui à son tour, par décarboxylation, se transforme en acide δ -aminolévulinique. Ce sont donc deux molécules de ce dernier corps qui se condensent pour former le noyau pyrrolique primitif : le porphobilinogène. Les formules suivantes résument l'ensemble de ces réactions :



Le rôle de l'acide δ -aminolévulinique dans la synthèse des porphyrines a été rapidement prouvé par plusieurs chercheurs, aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*. Après administration d'acide δ -aminolévulinique marqué par ^{14}C à l'Homme (BERLIN et coll., 1954) ou au rat (NEUBERGER et SCOTT, 1954) on a isolé des urines et des matières fécales du porphobilinogène et de la protoporphyrine radioactifs. D'autre part l'acide δ -aminolévulinique inhibe compétitivement l'utilisation du glycocolle et de l'acide succinique au cours de la biosynthèse de l'hème (SHEMIN et RUSSEL, 1953). Enfin, la dégradation systématique de l'hème, synthétisé par les globules rouges du Canard à partir de l'acide δ -aminolévulinique a permis d'établir que chaque atome de carbone de la protoporphyrine néoformée provenait de ce précurseur (SHEMIN, RUSSEL et ABRAMSKY, 1955).

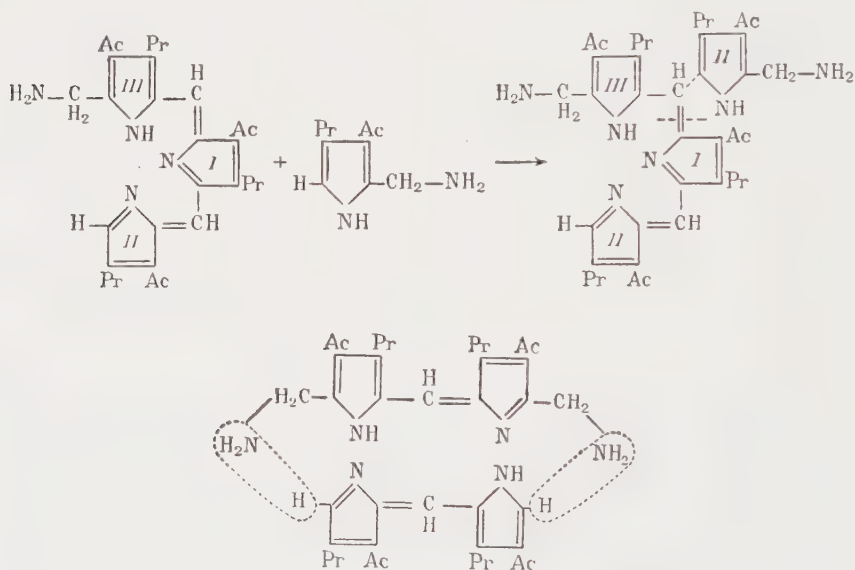
Le porphobilinogène possède deux groupements carboxyliques correspondant respectivement à un résidu acétylique et à un résidu propanoïque. L'assemblage de quatre molécules de porphobilinogène doit donc conduire à la formation de l'uroporphyrine, possédant 4 groupements acétyles et 4 groupements propanoïques. Cette conclusion, en accord d'ailleurs avec certaines observations biochimiques antérieures, s'est trouvée par la suite entièrement confirmée.

Le mécanisme biochimique de la condensation du porphobilinogène en uroporphyrine reste encore à l'heure actuelle du domaine de l'hypothèse. Le problème le plus difficile est l'explication de la genèse des deux isomères, I et III de l'uroporphyrine.

D'après GRANICK (1955), il se forme d'abord un dipyrrol- et un tripyrrol-méthène. Dans ces deux composés, les restes acétyles occupent respectivement les positions 1, 3, et 1, 3, 5.

La combinaison de deux dipyrrolméthènes donne, après oxydation, une uroporphyrine 1, 3, 5, 7-acétyl, donc de type isomérique I.

Quant au tripyrrolméthène, il fixe par son carbone 2, suivant la réaction effectuée par CORWIN, une nouvelle molécule de porphobilinogène (du côté du reste propanoïque), comme le montre la formule ci-dessous. La tétrapyrrolméthène ainsi formée se rompt alors suivant la ligne discontinue en deux dipyrrolméthènes, l'une 1, 4-acétyl, l'autre 1, 3-acétyl. La condensation de ces deux composés donne une uroporphyrine 1, 3, 5, 8-acétyl, c'est-à-dire du type isomérique III.



SHEMIN, RUSSEL et ABRAMSKY (1955) ont émis une opinion assez semblable. D'après ces auteurs, la condensation du porphobilinogène aboutirait à la formation d'un composé tripyrrolique. Suivant la façon dont s'opère la rupture de ce dernier corps, on obtiendrait soit un dipyrrol 1, 3-acétyl, soit un dipyrrol 1, 4-acétyl ayant deux chaînes latérales aminées. La fusion de deux dipyrrols renfermant les deux acétyles en position 1 et 3 donnerait, après élimination de l'ammoniaque et réduction, une uroporphyrine de type I tandis que l'union de deux dipyrrols différents (1, 3 et 1, 4-acétyl) aboutirait à l'uroporphyrine III. Dans ce dernier cas, un carbone en trop d'une des chaînes latérales aminées doit disparaître ; SCHMID et SHEMIN (1955) l'ont effectivement retrouvée, au cours d'expériences isotopiques, à l'état de formaldéhyde marquée.

Quoi qu'il en soit, c'est la décarboxylation partielle de l'uroporphyrine qui conduit à la coproporphyrine (4 groupes propanoïques). La coproporphyrine donne enfin naissance par décarboxylation de deux de ses groupements propanoïques, et par oxydation de deux groupements éthyles résiduels, à la protoporphyrine.

En réalité cette filiation est plus complexe. Comme l'a montré la première DRESEL (1955), par la méthode de l'incubation de l'hémolysat de sang de Poulet avec du glycolle marqué, les uro- et coproporphyrines ne représentent pas des véritables précurseurs de la protoporphyrine. L'adjonction au système d'incubation de copro- et d'uroporphyrine marquées par le ^{14}C , a permis de constater que ces substances ne se transformaient pas directement en protoporphyrine, mais que c'étaient leurs formes réduites, leurs chromogènes (uroporphyrinogène, coproporphyrinogène) qui étaient les vrais précurseurs. Ces chromogènes renferment 6 atomes de H de plus que l'uro- et la coproporphyrine, dont 4 s'attachent au carbone des ponts méthyléniques et 2 aux azotes pyrroliques.

La combinaison de la protoporphyrine avec le fer bivalent conduit enfin à la formation de l'hème.

LIEU DE FORMATION DE L'HÈME.

Un des résultats des plus inattendus des travaux modernes, est la découverte de la possibilité de la biosynthèse de l'hème en dehors des centres hématopoïétiques.

C'est ainsi que de très nombreuses expériences ont montré la formation de l'hème lors de l'incubation du sang de Poulet ou du sang périphérique de Lapin rendu anémique, soit par saignées, soit par administration de phénylhydrazine. On a également remarqué que dans ce dernier cas la cinétique de la formation de l'hème n'est pas proportionnelle au nombre des réticulocytes. Comme nous le verrons (p. 27) nos propres expériences ont montré que le sang périphérique du Lapin normal est également capable de réaliser la synthèse de l'hème.

Quant à la biosynthèse du porphobilinogène et des uro-, copro- et protoporphyrines, de nombreux organes sont susceptibles de la réaliser. Nous y reviendrons dans le chapitre III.

SYSTÈMES ENZYMATIQUES INTERVENANT DANS LA BIOSYNTHÈSE DE L'HÈME.

La complexité des processus biochimiques qui aboutissent à la synthèse de l'hème et le nombre relativement élevé des substances intermédiaires, laissent prévoir l'intervention de plusieurs systèmes enzymatiques au cours de ces réactions. C'est seulement au cours de ces dernières années que les techniques très sensibles de l'identification et de dosage de l'acide δ -aminolévulinique et du porphobilinogène et des différentes porphyrines ont permis d'aborder avec quelque chance de succès les problèmes enzymatiques de la biosynthèse de l'hème. Nos connaissances à ce sujet sont encore très partielles, mais permettent d'ores et déjà de dresser un tableau d'ensemble qui sera d'ailleurs sans doute complété et rectifié sur plus d'un point.

Ce schéma est certainement provisoire et se trouvera modifié sur certains points par des expériences ultérieures.

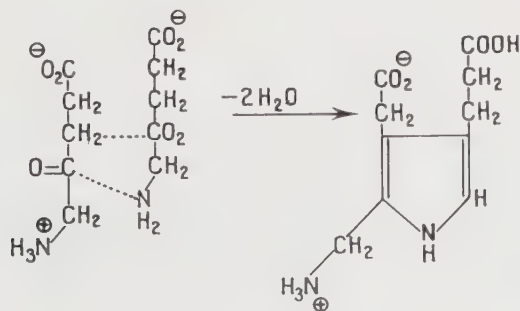
a) *Transformation de l'acide δ -aminolévulinique en porphobilinogène.*

Deux groupes de chercheurs ont isolé en 1954 de sources différentes l'enzyme catalysant la transformation de l'acide δ -aminolévulinique en porphobilinogène. SCHMID et SHEMIN (1955) obtiennent la préparation enzymatique par précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium d'un extrait de globules rouges de Canard. Cette préparation, d'une activité enzymatique élevée, transforme deux molécules d'acide δ -aminolévulinique en une molécule de porphobilinogène conformément à la théorie.

GIBSON et NEUBERGER (1954) partent d'une poudre acétonique de foie de Bœuf, dont l'extrait, après précipitations successives par le sulfate d'ammonium et adsorption sur phosphate tricalcique, donne un produit hautement actif. Cette préparation a permis à GIBSON et ses collaborateurs d'établir que l'enzyme, l'acide δ -aminolévulinique-déhydrase, possède des fonctions sulfhydryls. Le glutathion et la cystéine sont des activateurs. Le ferment est inhibé par l'iodacétamide, par le parachlorobenzoate mercurique, par l'éthylène diaminetétracétate disodique.

GRANICK (1958) utilise les érythrocytes de Poulet et de Lapin, et obtient une préparation enzymatique très purifiée par l'électrophorèse sur amidon. Le pH optimum est de 6,3 pour l'enzyme de Lapin et 6,7 pour celui de Poulet. GRANICK et MAUZERALL (1958 a) confirment la nature sulfhydrylique de l'enzyme et son inhibition par l'éthylène-diaminetétracétate, et ils attribuent ce dernier fait à la fixation par cet inhibiteur d'un métal essentiel pour l'activité enzymatique.

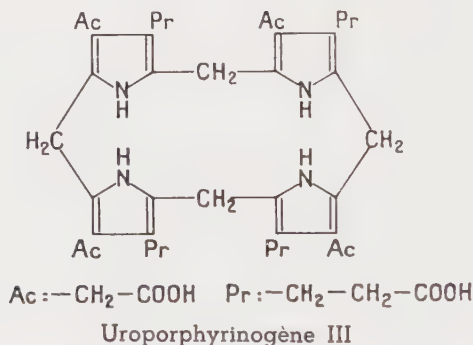
L'étude des inhibiteurs conduit ces auteurs à admettre la formation du porphobilinogène suivant la réaction décrite par KNORR. Un groupement carbonyle en position γ par rapport au carboxyl ionisé est nécessaire pour la combinaison du substrat avec la partie active de l'acide δ -aminolévulinique-déhydrase. L'étude cinétique de la réaction suggère d'autre part, que le ferment forme un complexe avec les deux molécules d'acide δ -aminolévulinique, plus solidement avec la première qu'avec la deuxième. La condensation enfin des deux molécules d'acide δ -aminolévulinique s'opère entre le troisième et quatrième carbone suivant le schéma ci-dessous :



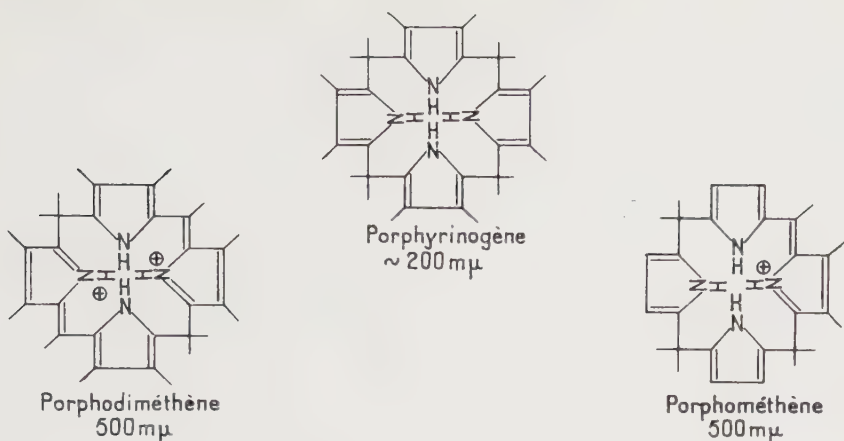
c) *Transformation du porphobilinogène en uroporphyrine.*

Les systèmes enzymatiques de cette transformation ont été étudiés à l'aide des préparations obtenues à partir des extraits de *Chlorella* (BOGORAD et GRANICK, 1953), des extraits de plantes (BOGORAD, 1958), des extraits de globules rouges de Poulet, de Lapin, d'Homme (GRANICK et MAUZERALL, 1958 a ; BOOIJ, et RIMINGTON, 1951 ; LOCKWOOD et RIMINGTON, 1957). Ces recherches ont révélé la complexité de la formation de l'uroporphyrine à partir du porphobilinogène. C'est ainsi qu'on a pu établir que le premier produit de la condensation du porphobilinogène était un chromogène : l'uroporphyrinogène, résultat de l'action d'une porphobilinogène-désaminase.

Lors de l'incubation de la préparation enzymatique avec le précurseur monopyrrolique en l'absence d'oxygène, on ne peut en effet observer l'apparition d'une porphyrine ; alors que celle-ci peut être facilement isolée après adjonction d'un oxydant et notamment de l'iode au milieu incubé. Cette porphyrine, suivant la source de la préparation enzymatique, a été identifiée soit à l'uroporphyrine I, soit à l'uroporphyrine III. En présence d'oxygène, le porphobilinogène se transforme en uroporphyrine, mais la courbe de la cinétique de la réaction permet d'envisager l'intervention de plusieurs enzymes dont deux au moins ont été séparés : la désaminase du porphobilinogène, qui lors de la condensation de celui-ci libère une molécule d'ammoniaque par molécule de porphobilinogène utilisée et conduit à la formation de l'uroporphyrinogène, et une oxydase, qui transforme l'uroporphyrinogène en uroporphyrine.



Cette dernière réaction ne s'opère pas d'ailleurs directement comme l'a montré l'analyse spectrophotométrique des produits de réaction. Avant l'apparition des bandes d'absorption de l'uroporphyrine, on note en effet une bande à 500 m μ d'une intensité croissante, puis décroissante au fur et à mesure qu'apparaissent les bandes de l'uroporphyrine. D'après MAUZERALL et GRANICK (1958), la transformation des quatre ponts [méthylénique (-CH₂-)] en ponts méthéniques (-CH=) s'opère progressivement et la substance intermédiaire donnant la bande à 500 m μ correspondrait au dérivé suivant :



Comme nous l'avons dit, certaines préparations enzymatiques (celles obtenues à partir des globules rouges) conduisent à l'uroporphyrine III, d'autres (celles provenant de l'Épinard) aboutissent à l'uroporphyrine I. Ces résultats laissent prévoir que la formation des deux isomères n'est pas liée au même système enzymatique.

Cette manière de voir s'est trouvée entièrement confirmée par les observations de BOGORAD et GRANICK (1953) qui ont noté que les extraits de *Chlorella*, préalablement chauffés à 55° pendant 60 minutes conduisaient à l'isomère I, tandis que les extraits non chauffés catalysaient la formation de l'isomère III. Ces auteurs ont conclu de ces observations que le chauffage détruisait un ferment thermolabile : l'uroporphyrine-isomérase, responsable de la formation de l'uroporphyrinogène III à partir de l'uroporphyrinogène I. BOGORAD et GRANICK ont montré par la suite que cet enzyme intervenait avant la formation de l'uroporphyrinogène en remaniant une ou deux des quatre molécules de porphobilinogène avant leur condensation. Le terme, uroporphyrine-isomérase est par conséquent assez peu heureux, puisqu'en réalité il s'agit, comme c'était à prévoir, d'une isomérisation du porphobilinogène.

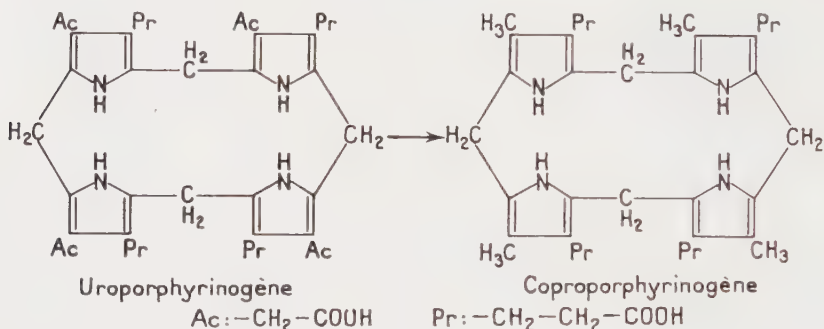
Tout récemment, GRANICK et MAUZERALL (1958 a), BOGORAD (1958), BOOIJ et RIMINGTON (1957), LOCKWOOD et RIMINGTON (1957) ont obtenu des préparations très purifiées de ces différents enzymes, soit par fractionnement au sulfate d'ammonium, soit par électrophorèse sur amidon. Ces préparations ont permis d'étudier les caractères biochimiques de ces différents enzymes.

La porphobilinogène-désaminase a son pH optimum entre 8 et 8,5. Contrairement à l'acide δ -aminolévulinique-déhydrase, elle n'est inhibée ni par l'iodoacétamide, ni par l'éthylène-diaminotétracétate disodique. Le glutathion, au lieu d'activer le ferment, exerce au contraire une inactivation de 30 p. 100 environ à la concentration de 10^{-2} M, les ions d'argent et de mercure, le parachloromercurisulfonate, la parachloromercuribenzoate, sont également des inhibiteurs puissants, alors que le fluorure de sodium même à une concentration relativement élevée (2×10^{-2} M) est sans effet inhibiteur.

L'oxydase, responsable de la transformation de l'uroporphyrinogène en uroporphyrine, ainsi que l'uroporphyrine-isomérase sont inhibées par l'hydroxylamine. Tous les deux enzymes sont thermolabiles.

d) *Décarboxylation de l'uroporphyrinogène en coproporphyrinogène.*

Cette transformation nécessite la décarboxylation de quatre groupements acétyle suivant le schéma suivant :



Le système enzymatique catalysant cette réaction a été tout récemment isolé à l'état assez purifié par MAUZERALL et GRANICK (1958) des réticulocytes de Lapin et des globules rouges de Poulet. Ces auteurs ont soumis l'hémolysat à une électrophorèse sur amidon et ils ont élué le ferment par une solution de tampon *iris* (2).

Pour étudier l'action de cette préparation enzymatique, GRANICK et MAUZERALL (1958 *b*) l'ont fait incuber à 38° pendant 4 heures à pH 6,8 avec de l'uroporphyrinogène obtenue par réduction de l'isomère I ou III de l'uroporphyrine cristallisée.

Ils ont constaté la formation d'un porphyrinogène que l'oxydation transforme en coproporphyrine I ou III, identifiée par son nombre chlorhydrique, par la position de sa bande de Soret et par chromatographie sur papier. L'enzyme a donc transformé l'uroporphyrinogène en coproporphyrinogène. MAUZERALL et GRANICK ont pu également déceler dans le milieu d'incubation une très petite quantité de porphyrinogène à 7, 6, et 5 groupes de carboxyle. La décarboxylation enzymatique de l'uroporphyrinogène se poursuit donc progressivement. Ces dernières observations complètent celles que plusieurs chercheurs ont fait chez des sujets atteints de porphyrie idiopathique, dont les urines et les matières fécales renferment des traces de porphyrines à 7, 6, 5, 3 et 1 groupes de carboxyles.

Le système enzymatique séparé par MAUZERALL et GRANICK présente une spécificité assez étroite. S'il décarboxyle les porphyrinogènes dont le nombre de COOH varie de 8 à 5, par contre il n'agit ni sur l'acide δ -aminolévulinique ni sur le porphobilinogène, ni sur l'uroporphyrine.

Ce dernier fait, l'absence d'action sur l'uroporphyrine, apporte une preuve décisive en faveur des observations, selon lesquelles l'uroporphyrine et la

(2) Trihydroxyméthylaminoéthane.

coproporphyrine ne sont pas les précurseurs physiologiques directs de la protoporphyrine (voir p. 9).

Le pH optimum de l'enzyme est situé à 6,8 environ, sans être influencé par la présence ou l'absence de l'oxygène. La cinétique d'action est plus grande en présence de l'isomère III de l'uroporphyrinogène comme substrat, qu'en présence de l'isomère I.

Lorsque le ferment agit sur un mélange des deux isomères de l'uroporphyrinogène, c'est toujours le coproporphyrinogène III qui prédomine en fin d'incubation.

L'étude des inhibiteurs a permis d'établir que le ferment était de nature sulfhydrylique et qu'il n'exigeait pas l'intervention d'un métal. On observe en effet une forte inhibition par les ions mercuriques, cuivriques, manganiques, par l'iodacétamide et par l'acide parachlormercuribenzoïque. Mais dans tous ces cas, l'activité est rétablie par adjonction du glutathion réduit au milieu d'incubation.

L'incubation du système enzymatique avec le coproporphyrinogène en présence de glutathion ne conduit pas à la formation de porphyrines ayant plus de quatre groupes carboxyliques. La réaction est donc irréversible, comme on pouvait s'y attendre.

e) *La transformation du coproporphyrinogène en protoporphyrine.*

Cette transformation est relativement complexe, car elle nécessite d'une part la décarboxylation de deux groupements propanoïques et une oxydation des deux groupements éthyles qui en résultent en groupement vinyle et d'autre part la transformation des ponts méthyléniques en ponts méthéniques.

Le système enzymatique responsable de la décarboxylation vient d'être décrit par GRANICK et MAUZERALL (1958 b). Ce système enzymatique est obtenu après broyage des globules rouges de Poulet, ainsi qu'à partir de cellules d'une algue (*Euglenia*).

Après une incubation de courte durée du coproporphyrinogène avec la préparation enzymatique, on trouve comme intermédiaire une porphyrine à trois groupements carboxyliques dans le milieu d'incubation. La décarboxylation du coproporphyrinogène est donc progressive, comme l'était celle de l'uroporphyrinogène. L'absence de l'oxygène empêche la réaction. L'*o*-phé-
nantrolène, le 8-hydroxyquinoléine-5-sulfamate déterminent une inhibition de 25 p. 100, tandis que le cyanure de potassium, l'arsénite, l'iodacétamide, le dinitrophénol, l'éthylènediaminetétracétate, l'hydroxylamine et le semicarbazide n'exercent pratiquement aucune action inhibitrice. Le coenzyme A et l'acide adénosinetriphosphorique sont sans influence sur la cinétique de la réaction, qui ne nécessite pas non plus la présence d'ions métalliques facilement dissociables. L'enzyme ne possède probablement pas de groupement sulfhydrylique.

L'enzyme catalyse seulement la transformation du coproporphyrinogène III et non celle du coproporphyrinogène I. C'est sans doute l'explication du fait qu'on n'a jamais décelé dans le règne animal ou végétal l'existence d'une protoporphyrine appartenant à l'isomérisation I.

La courte note préliminaire de GRANICK et MAUZERALL (1958 *b*) laisse prévoir que leur préparation renferme plusieurs enzymes. Il est en effet très probable que les modifications intervenant au niveau des groupements fonctionnels différents du coproporphyrinogène pour donner naissance à la protoporphyrine sont réalisées par des enzymes spécifiques.

f) *Incorporation du fer dans la protoporphyrine.*

On pourrait envisager que cette réaction s'opère sans intervention enzymatique. Dans une solution de pH 7, l'ion ferreux se combine en effet facilement avec une protoporphyrine se trouvant à l'état de dispersion monomoléculaire.

Néanmoins GOLDBERG et ses collaborateurs (1956) ont montré au cours de l'incubation du sang de Poulet avec les précurseurs biochimiques de la protoporphyrine, que l'incorporation du fer dans la protoporphyrine était dans l'organisme une réaction enzymatique. Par la suite, GOLDBERG (1958) a obtenu à partir des globules rouges du Poulet une préparation enzymatique réalisant la synthèse de l'hème en présence de la protoporphyrine et du fer radioactif (⁵⁹ Fe).

Le principe de la méthode est l'extraction du stroma globulaire par un tampon tris à pH 7,4, et l'élimination de tout élément particulaire par une centrifugation à grande vitesse. Cette préparation, conservée à -10°, ne perd son activité que lentement en 2 à 3 semaines. Le chauffage à 100° pendant 30 minutes l'inactive complètement.

GOLDBERG a également noté l'activation remarquable du système enzymatique par l'acide déshydroascorbique, par l'ergothionéine et par le glutathion réduit. Les concentrations optimales de l'activation sont respectivement 5×10^{-5} M, $2,4 \times 10^{-4}$ M et 6×10^{-3} M. Le fait que ces substances se trouvent pratiquement à la même concentration à l'intérieur des globules rouges, plaide en faveur de leur intervention dans la réaction *in vivo*.

CONCLUSION.

Notre exposé intentionnellement succinct montre, croyons-nous, l'immense somme de connaissances nouvelles que les recherches des 15 dernières années ont apporté dans le domaine de la biosynthèse de l'hème.

Nous savons maintenant avec certitude que la protoporphyrine est synthétisée à partir de deux précurseurs très simples : le glycocolle et l'acide acétique. Les étapes intermédiaires essentielles sont constituées par l'acide succinique, l'acide δ -aminolévulinique, le porphobilinogène, l'uroporphyrinogène, le coproporphyrinogène et la protoporphyrine.

Ces réactions nombreuses sont liées à l'interventions de systèmes enzymatiques spécifiques et un grand progrès a été tout récemment réalisé dans l'étude de ces derniers principes.

La synthèse de l'acide δ -aminolévulinique est catalysée par les systèmes enzymatiques du cycle de KREBS et fait également appel au système des cytochromes, au phosphate de pyridoxal, au coenzyme A et au glutathion.

Un enzyme de nature sulphydrylique l'acide δ -aminolévulinique-déshydrodrase transforme l'acide δ -aminolévulinique en porphobilinogène. Celui-ci

donne naissance sous l'action de la porphobilinogène-désaminase à l'uro-porphyrinogène, lui-même décarboxylé par une décarboxylase spécifique en coproporphyrinogène. Ces enzymes hydrosolubles n'exigent pas la présence d'oxygène.

Un système enzymatique de nature particulière transforme enfin le coproporphyrinogène en protoporphyrine en présence d'oxygène, et la combinaison de ce dernier pigment avec l'ion ferreux s'opère également sous l'action d'un enzyme spécifique, hydrosoluble.

CHAPITRE II

RECHERCHES PERSONNELLES

I. TECHNIQUES GÉNÉRALES EMPLOYÉES AU COURS
DES EXPÉRIENCES1. ÉTUDE DE LA COPROPORPHYRINE ET DE LA PROTOPORPHYRINE LIBRE
DES GLOBULES ROUGES *in vivo*.

Une grande partie de nos expériences ont consisté dans l'étude, *in vivo*, chez l'Homme d'abord et chez le Lapin ensuite, des modifications, soit pathologiques, soit expérimentales, du taux de la coproporphyrine et de la protoporphyrine libre dans les globules rouges.

Pour le dosage de ces pigments nous avons employé la méthode légèrement modifiée de GRINSTEIN et WINTROBE (1948). Cette technique est fondée sur l'extractibilité de la coproporphyrine et de la protoporphyrine par l'éther. Pour obtenir à partir de ce solvant séparément les deux pigments, on extrait d'abord la coproporphyrine par HCl à 1 p. 100, qui n'enlève pas la protoporphyrine. Celle-ci est ensuite extraite par HCl à 10 p. 100.

Deux à cinq cm³ de sang total sont soigneusement homogénéisés avec 50 cm³ d'un mélange d'acétate d'éthyle et d'acide acétique glacial en proportion de 3 à 1. On laisse reposer 15 à 20 minutes, puis on filtre dans une ampoule à décantation. Le résidu est lavé avec le mélange d'acétate d'éthyle et d'acide acétique, jusqu'à ce que le filtrat devienne incolore. Les filtrats sont lavés deux fois avec une solution aqueuse d'acétate de sodium à 3 p. 100. Les eaux de lavages réunies sont extraites avec 10 cm³ du mélange d'acétate d'éthyle et d'acide acétique pour récupérer les porphyrines restées dans les eaux de lavages. La totalité des fractions d'acétate d'éthyle et d'acide acétique sont extraites, sous contrôle de la lumière de Wood, par petites portions (3 à 5 cm³) d'acide chlorhydrique à 10 p. 100, jusqu'à ce que l'acide chlorhydrique ne donne plus de fluorescence rouge. Les portions d'HCl réunies sont additionnées d'acétate de sodium cristallisé jusqu'à l'obtention d'une couleur gris-bleu du papier rouge congo (pH = 4 environ). On extrait ensuite deux fois par un volume égal d'éther éthylique. A ce pH, le passage des porphyrines dans la phase étherée s'effectue rapidement à la suite d'une brève agitation, comme on peut s'en assurer par la fluorescence rouge. Les fractions étherées réunies sont lavées une fois avec une solution d'acétate de sodium à 3 p. 100 et une fois avec l'eau distillée. On extrait ensuite de l'éther, d'abord la coproporphyrine par de très petites portions (1 à 2 cm³) d'HCl à 1 p. 100 jusqu'à ce que l'acide ne donne plus de fluorescence, on complète la totalité des fractions réunies, si besoin, à 10 cm³. On continue ensuite l'extraction par HCl à 10 p. 100 jusqu'à épuisement de la fluorescence. Ce dernier extrait chlorhydrique contient la protoporphyrine.

La détermination de la teneur en porphyrines se fait à l'aide d'un spectrophotomètre, sous une épaisseur de 1 cm, à la longueur d'onde de 402 mμ pour l'extrait coproporphyrinique et à 409 mμ pour l'extrait protoporphyrinique. Ces

longueurs d'ondes correspondent aux bandes de Soret respectives des deux pigments en solution chlorhydrique.

La formule suivante permet de calculer la teneur des globules rouges en coproporphyrine en μg par cm^3 :

$$\frac{\text{Densité optique} \times 1,5 \times 10}{\text{valeur hématocrite}} \times \frac{100}{v}$$

v = le volume du sang total utilisé pour le dosage,

1,5 = la valeur inverse du coefficient d'extinction spécifique (3) de la coproporphyrine,

10 = coefficient de dilution.

On a l'habitude de donner les résultats pour 100 cm^3 de globules rouges.

Pour calculer la teneur en protoporphyrine, on remplace dans la formule ci-dessus le facteur de 1,5 par celui de 2,04 (valeur inverse du coefficient d'extinction spécifique, qui est de 0,49 pour la protoporphyrine).

La valeur normale de la protoporphyrine globulaire libre varie entre 30 à 60 μg pour 100 cm^3 de globules rouges, aussi bien chez l'Homme que chez le Lapin. A l'état physiologique, la quantité de coproporphyrine existant dans le même volume d'hématies est pratiquement indosable.

2. ÉTUDE DE LA SYNTHÈSE DES PORPHYRINES DANS LES ORGANES A PARTIR DE L'ACIDE δ -AMINOLÉVULINIQUE ET DU PORPHOBILINOGÈNE.

L'acide δ -aminolévulinique, nécessaire à ces expériences a été obligeamment mis à notre disposition par le Pr A. NEUBERGER de Londres.

Nous avons préparé nous-mêmes le porphobilinogène suivant la technique de WESTALL (1952), modifiée par RIMINGTON, KROLL et TOOTH (1956).

Technique de préparation du porphobilinogène.

L'urine provenant des sujets atteints de porphyrie essentielle ou bien de lapins intoxiqués par l'allylisopropyl-acétamide est amenée à pH 4 par l'adjonction d'acide acétique et agitée avec du talc pour adsorption des porphyrines. On filtre. Le filtrat est précipité méthodiquement par une solution d'acétate de mercure à 15 p. 100 jusqu'à disparition de la réaction d'EHRlich dans le surnageant.

Le précipité obtenu est suspendu dans une petite quantité d'eau et soumis à l'action d'un courant d'hydrogène sulfuré (deux gouttes d'une solution saturée d'alun d'ammoniaque empêchent la formation de grumeaux). Le précipité est séparé par centrifugation, lavé à l'eau ; les surnageants réunis renferment le porphobilinogène ; ils sont additionnés d'acétate de plomb à 10 p. 100. Il se forme un précipité de sulfure de plomb, qui est éliminé par filtration. Le filtrat est traité par l'acétate d'argent à 20 p. 100, on sépare le précipité qu'on lave par le nitrate d'argent à 1 p. 100.

Les phases aqueuses sont réunies et débarrassées de l'argent et du plomb par un courant de H_2S . On lave le précipité deux fois par l'eau, on réunit les surnageants et les eaux de lavages et on fait passer un courant d'air à travers la solution pour éliminer le H_2S .

La solution est ensuite de nouveau précipitée par l'acétate de mercure à 15 p. 100. Le précipité est de nouveau saturé par un courant de H_2S , on centrifuge, on lave le précipité ; les surnageants réunis sont débarrassés de H_2S par aération. On amène à pH de 4,2 ou 4,3 par l'ammoniaque et on abandonne une nuit à la glacière. Le porphobilinogène se cristallise. Les cristaux sont lavés par l'eau légèrement acétique, puis par l'acétone. Il est facile de préparer le chlorhydrate de porphobilinogène, qui se conserve très bien.

(3) Le coefficient d'extinction spécifique de la coproporphyrine pour une concentration de 1 μg par centimètre cube examiné sous 1 cm d'épaisseur est égal à 0,666.

Les expériences d'incubation d'homogénats de tissus avec l'acide δ -aminolévulinique ou le porphobilinogène ont été réalisées dans les conditions suivantes :

Nous avons mélangé, dans un Erlenmeyer de 100 cm³, 5 cm³ d'un homogénat d'organe, correspondant à 2 g de tissus, 250 à 300 μ g de porphobilinogène ou d'acide δ -aminolévulinique, 1 cm³ d'une solution de tampon phosphaté à pH 7,4, un mg de streptomycine, 1 mg de pénicilline et nous avons complété à 10 cm³ par une solution de NaCl à 0,9 p. 100. L'incubation est faite à 37° pendant 6 heures. Les récipients d'incubations sont soumis à une agitation de 30 mouvements de va-et-vient par minute.

La détermination du porphobilinogène et celle de l'uro-, copro- et protoporphyrine dans le milieu en fin d'incubation ont été pratiquées selon les techniques suivantes :

a) *Porphobilinogène.*

Un cm³ prélevé sur le mélange d'incubation est additionné de 4 cm³ d'eau distillée et de 1 cm³ d'une solution d'acide trichloracétique à 20 p. 100. On centrifuge à 2.500 tours/minute pendant 10 minutes ; le porphobilinogène reste dans le surnageant.

On verse dans chacun de deux tubes à essai 2,5 cm³ de surnageant et on ajoute à l'un 2,5 cm³ de réactif d'EHRLICH (4), dans l'autre, qui servira comme témoin, on verse 2,5 cm³ d'une solution préparée, comme le réactif d'EHRLICH, mais ne renfermant pas de diméthylaminobenzaldéhyde. En présence de porphobilinogène, il se produit une coloration rouge cerise, dont l'intensité est déterminée à 555 m μ .

Le coefficient d'extinction spécifique du porphobilinogène (E 1 p. 100/1 cm) est égale à 1136. Pour obtenir la teneur des 10 cm³ de liquide d'incubation en porphobilinogène en μ g, la valeur de la densité optique lue doit être multipliée par 876 (5), par le facteur de dilution (= 12, en tenant compte de l'adjonction du réactif d'EHRLICH) et par 10 (volume d'incubation).

$$\text{Porphobilinogène en } \mu\text{g} = \frac{\text{Densité opt.} \times 876 \times \text{dilution} \times 10}{100}$$

b) *Uroporphyrine.*

Les 9 cm³ restants de l'incubat sont soigneusement homogénéisés avec 200 cm³ d'un mélange d'acétate d'éthyle et d'acide acétique glaciale en proportion de 3 à 1 et abandonnés pour la nuit. Le lendemain, on filtre dans une ampoule de décantation et on lave le résidu avec le mélange d'acétate d'éthyle et d'acide acétique à plusieurs reprises. Les fractions réunies sont lavées avec une solution saturée d'acétate de sodium et les eaux de lavages réextraites par l'acétate d'éthyle. Les fractions réunies d'acétate d'éthyle sont encore une fois lavées avec une solution aqueuse d'acétate de sodium à 3 p. 100. Cette eau de lavage est contrôlée sous lumière de Wood ; si elle est fluorescente, la preuve de la présence de l'uroporphyrine est faite. Dans ce cas, on continue les lavages, jusqu'à l'épuisement de la fluorescence. Les eaux de lavages réunies contiennent donc la totalité de l'uroporphyrine présente dans le milieu d'incubation, la phase acétate d'éthyle et acide acétique restant après la séparation des eaux de lavages contient les copro- et protoporphyrines.

Pour extraire les uroporphyrines, on ajuste le pH des eaux de lavages réunies à 1,5 par HCl concentré sous contrôle d'une électrode de verre ; on ajoute 100 cm³ de cyclohexanone, on agite et on répète ensuite cette opération avec 50 cm³ de cyclohexanone. Les fractions de cyclohexanone réunies sont addition-

(4) 15 g de p-diméthylaminobenzaldéhyde + 65,5 cm³ HCl conc. + 194,4 cm³ CH₃COOH glaciale.

(5) L'inverse du coeff. d'extinction spéc. correspondant à 1 μ g pour 100 cm³ de porphobilinogène.

nées d'un volume égal d'éther, puis l'uroporphyrine est extraite par des petites portions d'acide chlorhydrique à 5 p. 100. La détermination du taux du pigment est faite au spectrophotomètre à la longueur d'onde de 405 m μ . Pour avoir la quantité de l'uroporphyrine en μg par cm^3 du milieu d'incubation, on multiplie la densité optique lue par 1,534 (6) et le volume final de l'extrait chlorhydrique.

c) *Coproporphyrine et protoporphyrine.*

Ces pigments sont extraits de la solution d'acétate d'éthyle et d'acide acétique mise de côté après extraction de l'uroporphyrine. L'extraction, le dosage et le calcul sont pratiqués suivant la technique indiquée pour l'étude des porphyrines libres des globules rouges, compte tenu de la différence de dilution.

3. L'ÉTUDE DE LA BIOSYNTHESE DE L'HÈME *in vitro*.

Nous avons étudié la formation de l'hème *in vitro* à partir des globules rouges périphériques du Poulet et du Lapin normal, ou préalablement rendu anémique, soit par saignées répétées (20 cm^3 de sang tous les jours pendant une semaine) soit par administration de phénylhydrazine (20 à 25 mg par kg, en une seule injection intramusculaire).

Pour réaliser ces expériences, nous avons fait incuber des globules rouges avec du glycolle non marqué, ou marqué soit par l'azote lourd (^{15}N), soit par le carbone radioactif (^{14}C) dans son groupement méthylénique ou carboxylique. En fin d'incubation, nous avons isolé la protoporphyrine globulaire libre à l'état pur d'une part et cristallisé d'autre part la protoporphyrine à partir de l'hème.

Dans d'autres expériences enfin, l'incubation du sang a été pratiquée en présence de fer radioactif (^{59}Fe) et du glycolle non marqué. Dans ces expériences nous avons en fin d'incubation, isolé et cristallisé l'hème sous forme de chlorhydrate d'hémine.

a) *Synthèse de l'hème à partir de glycolle marqué.*

Le sang de Poulet ou celui de Lapin normal ou préalablement rendu anémique est incubé pendant 4 heures à 37°.

Une fiole d'incubation contient :

- 25 cm^3 de sang total,
- 125 mg de glycolle radioactif, correspondant à une activité totale de 12,5 μc ,
- 1 cm^3 d'une solution streptomycine-pénicilline 1 p. 100,
- 1 cm^3 d'une solution de tampon phosphaté à pH 7,4.

Avant l'expérience d'incubation, on fait sur le sang une étude hématologique : numération des globules rouges, formule sanguine, dosage de l'hémoglobine, hématocrite, numération des réticulocytes, dosage de la protoporphyrine libre des globules rouges.

En fin d'incubation, chaque fiole est additionnée de 30 cm^3 d'eau distillée pour hémolyser les globules rouges. On transvase dans un grand becher de 800 cm^3 , et on y verse, en agitant continuellement, 400 à 500 cm^3 d'un mélange d'acétate d'éthyle et d'acide acétique en proportion de 3 à 1. On laisse reposer pendant la nuit à la température du laboratoire. Le lendemain, on filtre le mélange dans une ampoule à décantation. Le résidu est lavé par le mélange d'acétate d'éthyle et d'acide acétique et on lave ensuite le filtrat par une solution aqueuse d'acétate de sodium à 3 p. 100. On procède alors à l'extraction des porphyrines libres. Dans

(6) 1,534 est la valeur inverse du coefficient d'extinction spécifique de l'uroporphyrine $E_2 = 0,6517$.

certain cas, on extrait séparément les copro- et les protoporphyrines, le plus souvent, on les extrait ensemble. (Voir la méthode déjà décrite de GRINSTEIN et WINTROBE, p. 18).

Le mélange restant d'acétate d'éthyle et d'acide acétique, qui renferme l'hème, est évaporé sous basse pression en vue de l'estérification de l'hème (résidu A).

Le taux des porphyrines libres est déterminé dans la solution chlorhydrique. Ces porphyrines, (copro- et protoporphyrines) sont reprises séparément ou ensemble par l'éther et cette solution étherée est évaporée à siccité (résidu B).

On procède ensuite à l'estérification des résidus A et B.

Estérification du résidu A selon la méthode de GRINSTEIN (1947). Le résidu est dissous dans une très petite quantité de NaOH N/10 et versé dans un Erlenmeyer contenant 100 cm³ d'alcool méthylique renfermant 10 p. 100 d'acide acétique. On ajoute 3 à 5 g de FeSO₄ cristallisé réduit en poudre (pour faciliter la libération de la protoporphyrine de l'hème durant l'estérification). On fait passer très rapidement un fort courant d'acide chlorhydrique gazeux (préparé par introduction goutte à goutte d'acide sulfurique concentré dans un ballon contenant du chlorure d'ammoniaque), jusqu'au virage de la couleur brun sombre en rouge-violet, signe de l'estérification de la protoporphyrine. La solution est transvasée dans une grande ampoule de décantation et additionnée d'un excès d'eau et de chloroforme. En agitant avec précaution, l'ester méthylique de la protoporphyrine passe dans ce dernier solvant. Cette extraction est répétée plusieurs fois sous le contrôle de la lumière de Wood. On lave ensuite la solution chloroformique avec de grandes quantités d'eaux et on extrait les eaux de lavages avec de nouvelles fractions de chloroforme. Après de très nombreux lavages, on filtre le chloroforme à travers un triple filtre pour obtenir une solution absolument limpide et on la concentre au plus petit volume possible. Cette solution très concentrée est versée sur une colonne d'Al₂O₃ suspendu dans du benzène, le même solvant servant ensuite à l'élution de la protoporphyrine. La colonne retient beaucoup de pigments brunâtres et laisse passer la protoporphyrine pratiquement pure. La solution benzénique de protoporphyrine est évaporée à siccité. Pour sa cristallisation, le pigment est repris dans une très petite quantité de chloroforme. On chauffe doucement au bain-marie et on ajoute un excès d'alcool méthylique redistillée bouillant. Les cristaux sortent tout de suite ou bien après avoir laissé refroidir le mélange à basse température. On filtre les cristaux le lendemain tout en lavant par l'alcool méthylique d'abord, ensuite par l'éther. On obtient ainsi, grâce à la chromatographie préalable sur colonne, des beaux cristaux et la recristallisation devient le plus souvent inutile.

Les cristaux secs sont pesés et une quantité déterminée est posée sur une planchette, dont le fond est garni de papier filtre ultra-fin (*Lens paper*), on y laisse tomber 1 ou 2 gouttes de chloroforme pour obtenir un étalement en couche égale et très mince. La radioactivité de cette préparation est déterminée à l'aide d'un compteur GEIGER-MÜLLER à gaz, sans fenêtre.

Estérification du résidu B (DRESEL et FALK, 1954). Le résidu sec est repris par l'alcool méthylique contenant 5 p. 100 d'acide sulfurique concentré, et abandonné pendant quelques heures à la température du laboratoire, ce qui assure l'estérification des porphyrines libres. On fait passer ensuite les esters porphyriniques dans le chloroforme et on procède aux lavages et à la concentration de la solution chloroformique suivant la technique employée pour le résidu A.

La solution chloroformique, réduite ainsi à un très petit volume, est versée sur une colonne d'oxyde de magnésium suspendu dans du chloroforme lavé et redistillé. Cette colonne doit être d'un diamètre très faible (moins d'un centimètre), mais par contre d'une hauteur élevée (au moins 25 cm). Elle est longuement lavée avec de petites portions de chloroforme lavé et redistillé, ce qui permet l'élimination des impuretés radioactives. On élue ensuite les porphyrines avec quelques gouttes de chloroforme non distillé (renfermant donc de l'alcool méthylique). Après avoir déterminé la teneur de l'éluat en porphyrines, on dépose un volume connu sur une planchette garnie de *lens paper* pour mesurer la radioactivité.

Dans quelques expériences, le sang a été incubé avec du glyocolle marqué par l'azote lourd (^{15}N). Dans ces cas, l'isolement et la cristallisation de la protoporphyrine hémoglobinique, et la purification de la copro- et protoporphyrine libres ont été pratiqués suivant les techniques indiquées ci-dessus. La teneur en ^{15}N a été déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre de masse. (Cette mesure a été pratiquée dans le laboratoire du Pr COURSAGET.)

b) *Étude de la biosynthèse de l'hème in vitro à l'aide de ^{59}Fe .*

Vingt-cinq cm^3 de sang total sont mis à incuber avec 125 mg de glyocolle non marqué et avec 2 μg de $^{59}\text{FeCl}_3$ environ, correspondant à une activité totale de 0,2 à 0,3 μc . Le milieu d'incubation est complété avec une solution de tampon tris (7) à pH 7,4.

Pour doser la protoporphyrine globulaire libre néoformée, on fait incuber 25 cm^3 de sang dans une fiole témoin avec du glyocolle et du fer non radioactifs.

Après quatre heures d'incubation à 37° , on procède au dosage de la protoporphyrine libre dans la fiole témoin selon la technique déjà décrite (voir p. 18) et à la cristallisation de l'hème des autres fioles sous forme de chlorhydrate d'hémine, selon la technique de SHERMAN (1950).

On chauffe 50 cm^3 d'acide acétique glacial, contenant 0,5 cm^3 d'une solution de NaCl saturée, dans un Erlenmeyer de 250 cm^3 , à 108° et on y verse, goutte à goutte, le contenu d'une fiole d'incubation en maintenant la température entre 108 et 103° . On peut préalablement hémolyser le sang du milieu d'incubation en ajoutant un volume égal d'eau distillée, on centrifuge et on verse le surnageant, goutte à goutte, dans la solution d'acide acétique chauffée. On abandonne ensuite à la température du laboratoire ou en chambre froide jusqu'au lendemain. A ce moment, la cristallisation, amorcée pendant le chauffage, sera complète. On centrifuge ; la solution mère est décantée et les cristaux sont lavés 2 fois par acide acétique à 50 p. 100, deux fois avec de l'eau distillée, une fois rapidement avec de l'alcool absolu et deux fois avec de l'éther. On centrifuge pendant 2 minutes entre chaque lavage. Les cristaux sont ensuite desséchés dans un four à 105° jusqu'au lendemain. Après refroidissement, les cristaux seront au besoin recristallisés : on dissout les cristaux dans 0,5 cm^3 de pyridine, on ajoute une quinzaine de cm^3 de chloroforme et on filtre en lavant le papier filtre avec du chloroforme. Le filtrat est transvasé dans un Erlenmeyer contenant 30 cm^3 d'une solution d'acide acétique glacial saturée de NaCl. On ajoute une ou deux perles de verre et on chauffe le mélange exactement jusqu'à 108° . A ce moment on retire l'Erlenmeyer de la plaque chauffante (ou du bain d'huile), on y laisse tomber une goutte de HCl concentré et on transvase immédiatement dans un tube à centrifuger. On laisse reposer jusqu'au lendemain et on procède aux centrifugations et lavages comme ci-dessus. Les cristaux sont desséchés dans un four à 105° ; après refroidissement, on dépose une quantité pesée sur une planchette garnie de *lens paper* et on y laisse tomber une ou deux gouttes de pyridine pour obtenir une couche mince et uniforme.

La radioactivité est déterminée à l'aide d'un compteur à scintillation et, si nécessaire, on procède à des recristallisations jusqu'à obtenir une radioactivité constante.

4. TECHNIQUE D'INCUBATION POUR ÉTUDIER L'INCORPORATION ENZYMATIQUE DU FER DANS LA PROTOPORPHYRINE.

a) *Technique de la préparation du système enzymatique catalysant l'incorporation du fer dans la protoporphyrine.*

Nous avons employé la technique décrite par GOLDBERG (1958) : 100 à 200 cm^3 de sang de Poulet ou de Lapin sont centrifugés, lavés deux fois avec du sérum

(7) Tampon tris : 5,4 g de trihydroxyméthylaminoéthane sont dissous en 17,5 cm^3 d'HCl 2N et complétés à 100 cm^3 avec de l'eau distillée. On ajuste le pH à 7,4.

physiologique et la couche leucocytaire est enlevée. Les centrifugations sont effectuées à 0°. Un volume et demi d'eau distillée glacée est additionné aux globules et après agitation énergique de 5 minutes, l'hémolysat est abandonné pour une nuit à la glacière.

Le lendemain, on centrifuge l'hémolysat à 4° pendant 30 minutes à 2 200 tours / minute ; après décantation du surnageant on lave le stroma avec de l'eau distillée glacée. Le stroma est ensuite énergiquement broyé et homogénéisé dans un broyeur DUREL refroidi et additionné d'un volume de tampon tris (pH 7,4) pour 6 volumes de stroma broyé. On centrifuge cet homogénat pendant 30 minutes à 4° et 2 200 tours / minute. Le surnageant est ensuite recentrifugé pendant 30 minutes à 4°, mais cette fois à grande vitesse (14 000 tours / minute). C'est cette solution, libre de particules, qui contient le système enzymatique décrit par GOLDBERG.

b) Technique d'incubation et de séparation de l'hème formé.

Une fiole standard contient :

— Protoporphyrine ($5 \times 10^{-5} M$)	1 cm ³
— ⁵⁹ FeCl ₃ (0,15 à 0,3 µc)	1 cm ³
— FeCl ₃ entraîneur (10 µg Fe / cm ³)	0,2 cm ³
— Préparation enzymatique	5 cm ³
— Tampon Tris à pH 7,4	2,8 cm ³

La protoporphyrine est préparée à partir de globules rouges selon la technique décrite (voir p. 22). Les cristaux d'ester méthylique de protoporphyrine très purs sont hydrolysés avec HCl à 25 p. 100 pendant 24 heures ; la solution chlorhydrique est évaporée dans un dessiccateur sur pastilles de potasse et dissoute ensuite dans une solution de NaHCO₃ 7M. On ajuste le pH à 7,4 environ à l'aide de HCl 2N.

Si la solution de fer radioactif contient 2 à 3 µg de fer par cm³ pour la radioactivité nécessaire, il est inutile d'ajouter une solution de FeCl₃ entraîneuse.

L'incubation de courte durée (3 à 4 heures) ne nécessite pas l'adjonction d'antibiotiques.

Au cours de chaque expérience, on fait incuber une fiole témoin, contenant la protoporphyrine en solution tamponnée et le fer radioactif, sans préparation enzymatique. Les fioles sont soumises à une agitation continue en raison de 30 mouvements de va-et-vient par minute, dans un bain-marie chauffé à 37°.

A la fin de l'incubation, on prélève de chaque fiole 0,2 cm³ pour la détermination de la concentration en hémoglobine. Chaque fiole est ensuite additionnée de 25 cm³ d'un hémolysat entraîneur d'une teneur connue d'hémoglobine (préparé à partir des globules lavés de poulet ou de lapin additionnés de 2,5 volumes d'eau distillée et abandonnés à la glacière, on centrifuge avant l'utilisation) et d'une solution de KCN M/10 (0,162 g / 25 cm³) pour arrêter toute activité enzymatique. Après avoir bien mélangé le contenu de la fiole avec l'hémolysat entraîneur, on procède à la cristallisation de l'hème sous forme de chlorhydrate d'hémine, soit par la méthode décrite plus haut (p. 23), soit par la technique de FABRE et NISHIDA (1957), technique qui nous a paru supérieure par son rendement à la précédente :

Une solution mère de 2 p. 100 de chlorure de strontium en acide acétique glacial est préparée. Pour obtenir le solvant d'extraction, on mélange extemporanément (pour éviter la cristallisation du Cl₂ Sr) 1 volume de la solution mère et 3 volumes d'acétone. On ajoute le contenu des fioles d'incubation à 12 volumes de solvant en agitant bien. On laisse reposer 20 à 30 minutes en agitant de temps à autre. On filtre ensuite et le résidu est lavé deux fois par le solvant d'extraction. Les filtrats réunis sont versés dans un becher et on chauffe sur une plaque chauffante à 100-102°. La cristallisation commence pendant que la solution se concentre et devient complète pendant le refroidissement à la température du laboratoire. On centrifuge les cristaux et on les lave 2 fois avec CH₃ COOH à 50 p. 100, deux fois avec de l'eau distillée, une fois avec de l'alcool éthylique absolu et

deux fois avec de l'éther. On dessèche les cristaux à 105° et on recristallise le lendemain en dissolvant les cristaux dans un mélange de pyridine-chloroforme (très peu de pyridine). On ajoute à volume égal la solution de chlorure de strontium à 2 p. 100, on filtre et on chauffe le mélange à 100°. On abandonne à la température du laboratoire et les cristaux sont centrifugés et lavés le lendemain comme au cours de la première cristallisation. Après dessiccation à 105°, on dépose une quantité connue de cristaux sur une planchette, comme décrit plus haut, et on détermine la radioactivité par un compteur à scintillation. La radioactivité est exprimée en coups par minute par mg de protoporphyrine ajoutées au milieu d'incubation.

CHAPITRE III

EXPOSÉ DES RECHERCHES PERSONNELLES

I. ÉTUDE DE LA PROTOPORPHYRINE LIBRE DES GLOBULES ROUGES *IN VIVO*

Les globules rouges des Vertébrés contiennent 30 à 60 μg de protoporphyrine à l'état libre, non hémoglobinique pour 100 cm^3 . Le taux de cette protoporphyrine libre, chimiquement identique à la protoporphyrine hémoglobinique, présente dans les conditions physiologiques une grande constance. L'origine de ce pigment a soulevé beaucoup de discussions. Tout d'abord on a pensé qu'il provenait de la dégradation du pigment sanguin. Cette manière de voir s'est révélée rapidement erronée. D'ailleurs le mécanisme biochimique de la biligénèse l'a rendue peu probable. On a en effet établi que la dégradation de l'hémoglobine conduisait aux pigments biliaires. Au cours du catabolisme de l'hémoglobine, le fer ne quitte la molécule qu'après l'ouverture du cycle porphyrinique (LEMBERG, 1949). D'ailleurs, même les réactifs très agressifs, employés au cours du dosage de la protoporphyrine libre des globules rouges, comme par exemple l'acide chlorhydrique à 5 ou 10 p. 100 et appliqués à une solution d'hémoglobine cristallisée, ne permettent pas d'isoler de la protoporphyrine. D'autre part, le taux de la protoporphyrine libre n'augmente pas, lorsqu'on garde le sang pendant plusieurs jours.

Il a donc été logique d'envisager que la protoporphyrine libre était d'origine synthétique et correspondait à l'excès de ce pigment non utilisé pour la formation de l'hème.

Des faits observés en hématologie complètent bien les observations biochimiques. On a noté qu'au cours des périodes de réparation des anémies secondaires, le taux de la protoporphyrine libre augmentait d'une façon notable dans les hématies (CARTWRIGHT et coll., 1948 ; BÉNARD et coll., 1958).

Nous nous sommes proposé de mettre en évidence l'origine synthétique de la protoporphyrine libre, d'une part *in vitro* par la méthode de l'incubation du sang périphérique avec le glyocolle, d'autre part *in vivo* en étudiant le comportement de ce pigment au cours des anémies provoquées chez le Lapin.

SHEMIN, LONDON et RITTENBERG (1948) ont montré la biosynthèse de la protoporphyrine hémoglobinique à partir du glyocolle marqué dans le sang périphérique du canard, ou du lapin préalablement rendu anémique.

Nous avons incubé avec du glyocolle le sang du Lapin rendu anémique par intoxication phénylhydrazinée (BÉNARD, coll., 1951 *b*). En fin d'incubation, nous avons extrait la protoporphyrine libre des globules rouges et nous avons constaté, dans toutes nos expériences, une très forte augmentation du taux du pigment. Cette augmentation, correspondant de 60 à 120 μg pour 100 cm^3 de sang, était du même ordre de grandeur que celle de la synthèse protoporphyrinique notée dans des conditions semblables par SHEMIN et ses collaborateurs à l'aide de la méthode des isotopes.

Le tableau I résume les données numériques de plusieurs de nos expériences.

TABLEAU I.

N° du lapin	Nombre de réticulocytes pour 100 globules rouges	Protoporphyrine globulaire en μg pour 100 cm^3 de sang	
		avant incubation	après incubation
1	5	23	100
2	20	24	130
3	10	40	110
4	29	40	175
5	23,5	24	100
6	22	24	140
7	32	22	60

Nous avons noté, comme SHEMIN et ses collaborateurs (1948) l'ont fait pour la biosynthèse de l'hème au cours des expériences semblables, que la formation *in vitro* de la protoporphyrine était indépendante du nombre des réticulocytes. La synthèse, en effet, peut faire entièrement défaut ou exister d'une façon manifeste en présence de degrés identiques de réticulocytose. Il en est de même en ce qui concerne le nombre des hématies nucléées. Nous reviendrons sur ce problème plus en détail (voir p. 28).

D'autre part, nous avons observé que cette biosynthèse *in vitro* de la protoporphyrine libre était influencée par les mêmes facteurs et de la même manière que l'était la biosynthèse de l'hème dans les expériences de l'école de RITTENBERG.

Nous avons noté, en effet, que lors de l'incubation du sang humain à 37° ou lors de l'incubation à 0° du sang du lapin anémique, le taux de la protoporphyrine libre n'augmentait pas (tableau II).

TABLEAU II.

Provenance de 5 cm^3 de sang incubé avec 100 mg de glycocolle pendant 16 heures	Protoporphyrine globulaire en μg pour 100 cm^3 de sang	
	avant incubation	après incubation
Sang humain (anémie secondaire).....	60	56
Sang humain (sujet normal)	22	22
Lapin non préparé.....	17	25
Hémolysat de sang de Lapin préparé par la phénylhydrazine	24	18
Hémolysat de sang de Lapin préparé par la phénylhydrazine	24	20
Sang de Lapin préparé, incubation à 0° ...	19	20

Comme le montre le tableau II, la concentration en protoporphyrine libre subit, pendant l'incubation du sang de lapin normal, une très légère augmentation. Nous avons pensé à cette époque, que cette hausse n'était pas significative. Ce n'est que beaucoup plus tard, par emploi de glycolle radioactif que nous avons pu mettre en évidence la biosynthèse de l'hème par le sang périphérique du lapin normal (voir p. 38).

L'étude du milieu en cours d'incubation nous a permis de constater la présence de l'uro- et de la coproporphyrine en plus de la protoporphyrine libre (BÉNARD et coll., 1952 a). La concentration en uro-porphyrine et coproporphyrine des globules rouges baisse après un temps d'incubation prolongée, alors que la concentration en protoporphyrine continue à augmenter. Ces faits sont faciles à expliquer si l'on admet que l'uroporphyrine et la coproporphyrine — ou d'après nos connaissances actuelles, l'uroporphyrinogène et le coproporphyrinogène — sont des précurseurs dans l'organisme de la protoporphyrine.

Il nous semblait intéressant d'étudier le laps de temps pendant lequel les globules rouges conservent *in vivo* cette faculté de synthèse de la protoporphyrine après une seule injection de phénylhydrazine.

Pour étudier ce problème, nous avons administré par voie intramusculaire, une dose unique de 60 mg de phénylhydrazine à nos Lapins et incubé du glycolle avec du sang prélevé dans des intervalles différents (BÉNARD et coll., 1951).

Nous avons inscrit dans le tableau III les résultats de quelques-unes de ces expériences.

TABLEAU III.

Date par rapport à l'injection* (Les nombres indiquent les jours écoulés depuis l'injection)	Nombre de globules rouges en millions par mm ³ de sang	Hémo- globine en p. 100	Réticu- locytes	Hématies nucléées	Protoporphyrine libre en µg pour 100 cm ³ de globules rouges	
			Pour 100 globules rouges		avant incubation	après incubation **
Avant	4,300	76	4	0	30	29
3	2,380	35	18	1	113	2 680
8	2,460	45	12	2	298	3 697
11	3,940	83	8,5	1	65	146
14	3,990	92	8	0	45	105
18	4,460	74	6	0	34	142
25	4,520	76	4	0	55	150
39	5,100	88	3	0	60	96
Avant	4,200	62	4	0	27	28
3	1,260	26	16	1	206	3 366
8	2,460	35	16	2	428	3 060
11	4,140	75	9	0	76	131
14	4,320	72	10	1	62	173
18	4,940	82	10	0	58	139
25	4,480	78	7	0	52	110
39	4,820	85	4	0	55	112

* De 60 mg de phénylhydrazine.

** 4 heures d'incubation de 2 cm³ de sang avec 20 mg de glycolle.

Comme on le voit, la capacité des globules rouges de synthétiser la protoporphyrine augmente rapidement et se maintient à un niveau très élevé pendant 8 jours environ, délai qui correspond au retour du nombre des globules rouges à leur valeur initiale. L'intensité de la synthèse baisse ensuite brusquement, mais elle est encore nettement décelable 39 jours après l'intoxication.

Pour apporter de nouveaux arguments expérimentaux en faveur de l'origine synthétique de la protoporphyrine libre des globules rouges, nous avons administré à des lapins normaux une dose unique de 15 mg d'acide folique ou 20 μ g de vitamine B₁₂ et suivi les variations du taux de la protoporphyrine en faisant des prélèvements de sang d'abord à quelques heures d'intervalle et ensuite à des intervalles plus espacés pendant 3 à 4 semaines (BÉNARD et collaborateurs, 1950 et 1950 b). Les résultats numériques de nos observations sont résumés dans les tableaux IV et V.

TABLEAU IV.

N° du Lapin	Temps	Globules rouges en millions par mm ³	Hémo-globine en p. 100	Protoporphyrine globulaire en μ g pour 100 cm ³ d'hématies	Corporporphyrine en μ g par litre d'urine
I	Avant inj. de 15 mg d'acide folique....	5,620	93	6,6	48
	2 h 1/2 après.....	7,020	95	37,5	
	5 h 1/2 après.....	7,000	93	57	
	1 j après.....	6,500	93	86	100
	2 j après.....	6,000		65	
	8 j après.....	5,000		65	
	20 j après.....	5,400	90	3,6	
II	Avant inj. de 15 mg d'acide folique....	4,800	90	indosable	
	4 h après.....	5,500	90	27	
	1 j après.....	5,340	88	31	
	2 j après.....	5,300	90	48	
	16 j après.....	5,000	90	20	
III	Avant inj. de 15 mg d'acide folique....	4,500	85	indosable	18
	6 h après.....	5,350	85	18	
	1 j après.....	5,280	85	44	140
	4 j après.....	4,900	82	59	
	15 j après.....	4,700	82	49	
	20 j après.....	4,700	82	20	

Comme on le voit, l'acide folique et la vitamine B₁₂ sont capables d'accélérer *in vivo* aussi bien la formation des globules rouges que la synthèse de la protoporphyrine globulaire libre. Le taux du pigment monte sensiblement déjà quelques heures après l'administration d'acide folique, l'effet de la vitamine B₁₂ ne se manifeste à cet égard le plus souvent qu'après 1 à 3 jours. On peut également constater la différence d'action des deux vitamines sur la porphyrinurie : celle-ci augmente rapidement après l'administration d'acide folique et reste inchangée après injection de vitamine B₁₂.

TABLEAU V.

N° du Lapin	Temps	Globules rouges en millions de mm ³	Hémo- globine p. 100	Réticulo- cytes p. 100 globules rouges	Protopor- phyrine en µg pour 100 cm ³ de globules rouges	Copropor- phyrine en µg par litre d'urine
Lapin 1 20 µg de B ₁₂	Avant.....	4,770	88	2	indosable	64
	6 h après.....	4,710	88	3	16	
	30 h après.....	4,550	85	3	64	
	76 h après.....	6,060	88	9	72	
	12 j après.....	6,000	96	3,4	141	
	32 j après.....	6,135	99		37,4	
Lapin 2 20 µg de B ₁₂	Avant.....	6,580	111	2	32	
	6 h après.....	6,360	111	2	39	
	30 h après.....	5,820	90	4	70	
	4 j après.....	5,150	88	12	73	
	6 j après.....	5,900	92,5		19	
Lapin 3 20 µg de B ₁₂	Avant.....	5,320	86	2	28	84
	24 h après.....	5,660	81	2	70	84
	4 j après.....	5,860	85	6	99	
	7 j après.....	4,970	74		5,6	
Lapin 4 20 µg de B ₁₂	Avant.....	6,320	92,5	1	indosable	
	1 j après.....	8,560	89,5	8	7	
	3 j après.....	6,200	85		77	
	7 j après.....	5,500	85		41	
	18 j après.....	5,600	74		37	
Lapin 5 20 µg de B ₁₂	Avant.....	6,100	107	2	11	indosable
	1 j après.....	6,180	99		42	indosable
	4 j après.....	6,000	85		36	
	8 j après.....	6,000	118		60	0
	12 j après.....				45	
	23 j après.....	6,500	93		28	
Lapin 6 20 µg de B ₁₂	Avant.....	6,200	114		9	77
	3 j après.....	7,000	94		58	45
	6 j après.....	5,800	86		75	
	13 j après.....	6,580	81		103	0
	16 j après.....	6,300	81		78	

TABLEAU VI.

	I	II	III	IV
Sang	10 cm ³	10 cm ³	10 cm ³	10 cm ³
Glycocolle.....	—	100 mg	100 mg	100 mg
Acide folique.....		—	7,5 mg	—
Vitamine B ₁₂	—			10
Proto. glob. libre pour 100 cm ³ de sang après 16 h. d'incubation à 37°.....	84 µg	152 µg	180 µg	200 µg

La différence de la rapidité de l'action sur la protoporphyrine globulaire libre et l'effet entièrement dissemblable sur la prophyrinurie, indiquent que les deux vitamines n'agissent pas sur le métabolisme des porphyrines par des voies chimiques tout à fait identiques.

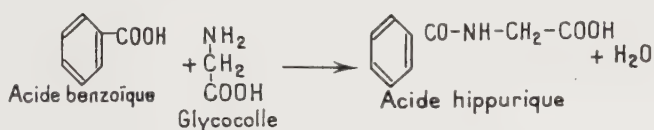
Il nous semblait intéressant de vérifier cette action de la vitamine B₁₂ et de l'acide folique au cours des expériences *in vitro* (BÉNARD, GAJDOS et GAJDOS-TÖRÖK, 1951 a).

A cet effet, nous avons incubé le sang du Lapin (rendu anémique par une injection intramusculaire de 60 mg de phénylhydrazine) avec du glyocolle en présence de vitamine B₁₂ ou d'acide folique, et nous avons extrait en fin d'expérience la protoporphyrine libre du milieu d'incubation. Le tableau VI montre les résultats numériques d'une de nos expériences.

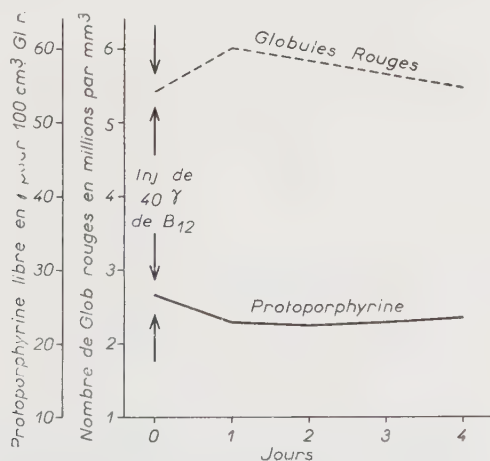
Nous retrouvons donc l'augmentation de la synthèse protoporphyrinique sous l'action des deux vitamines étudiées.

Le glyocolle représentant une matière première indispensable à la formation des porphyrines, il était logique de penser que, chez le lapin privé de ses réserves en glyocolle, la vitamine B₁₂ ou l'acide folique ne provoque pas d'hyperprotoporphyrurie globulaire si celle-ci est réellement due à un processus de synthèse.

Nous avons donc épuisé — ou tout au moins fortement diminué — les réserves en glyocolle du Lapin par trois injections quotidiennes de 1 g de benzoate de sodium, substance s'éliminant avec les urines sous forme d'acide hippurique (BÉNARD, GAJDOS et GAJDOS-TÖRÖK, 1953 a).



Nous avons ensuite administré au Lapin ainsi préparé 20 à 40 µg de vitamine B₁₂ ou 15 mg d'acide folique. Dans ces conditions, nous n'avons pu mettre en évidence une augmentation significative de la protoporphyrine libre, comme le montrent les deux figures ci-dessous.

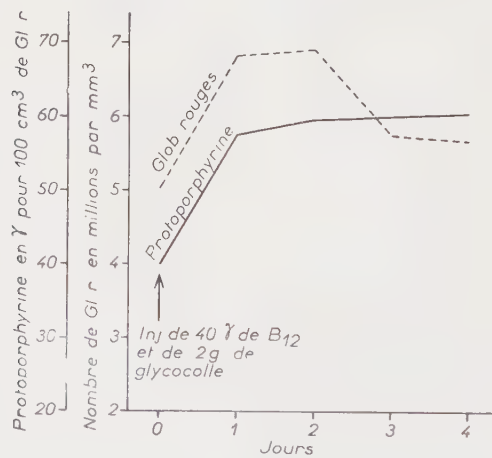


Injection de benzoate de sodium, absence d'augmentation de la protoporphyrine globulaire libre après administration de vitamine B₁₂.

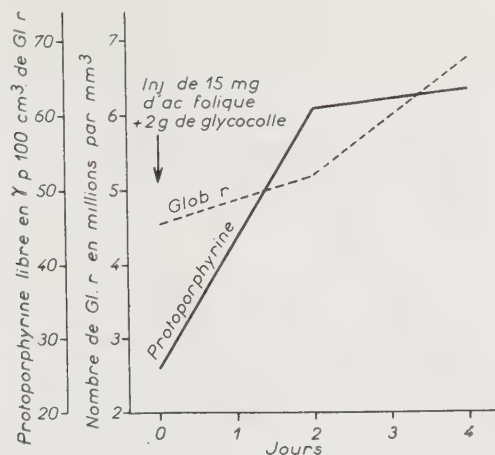


Injection de benzoate de sodium, absence d'augmentation de la protoporphyrine globulaire libre après administration d'acide folique.

Ces observations ont été confirmées par nos contre-expériences. Lors de l'injection simultanée de 2 g de glycolle et de vitamine B₁₂ ou d'acide folique au lapin préalablement traité par l'acide benzoïque, nous avons observé, dans les jours suivants, une forte poussée d'hyperprotoporphyrurie :



Injection simultanée de benzoate de sodium et de glycolle, augmentation nette de la protoporphyrine globulaire libre sous l'action de la vitamine B₁₂.



Injection simultanée de benzoate de sodium et de glycolle, augmentation nette de la protoporphyrine globulaire libre sous l'action de l'acide folique.

Ces expériences semblent montrer d'une façon objective que l'hyperprotoporphyrine globulaire libre déterminée par la vitaine B₁₂ ou par l'acide folique est réellement due à l'accélération de la synthèse du pigment.

Nous avons apporté enfin une preuve encore plus directe de l'origine synthétique de la protoporphyrine libre globulaire à l'aide de l'emploi de glycolle marqué (GAJDOS-TÖRÖK et coll., 1952). Dans ce but nous avons incubé le sang périphérique du Poulet avec du glycolle marqué par l'azote lourd (N₁₅) et isolé ensuite du milieu d'une part les copro et protoporphyrines se trouvant à l'état libre dans les hématies et d'autre part la protoporphyrine hémoglobinique (tabl. IX).

TABLEAU IX.

N° d'expérience	Pour cent de N ¹⁵ en excès dans l'azote du glycolle ajouté au milieu	Pigment analysé	Concentration (en µg pour 100 cm³ de globules rouges)		Pourcentage de N ¹⁵ en excès
			avant l'incubation	après l'incubation	
1	4,00	Protoporphyrine + Coprotoporphyrine globulaire libre.....	33	4812	0,59
		Protoporphyrine isolée de l'hème.....			0,08
2	3,70	Protoporphyrine globulaire libre.....	25	1166	3,20
		Protoporphyrine isolée de l'hème.....			0,03
3	3,70	Coprotoporphyrine globulaire.....	10	375	5,12 *
		Protoporphyrine globulaire libre.....	22	6429	2,67
		Protoporphyrine isolée de l'hème.....			0,19

* La faible quantité de coprotoporphyrine isolée à l'état pur a nécessité, pour le dosage de N¹⁵ dans cet échantillon, une dilution importante par de l'azote ordinaire. Cette dilution introduit une erreur pouvant expliquer que le pourcentage de N¹⁵ trouvé (5,12 p.100) dépasse la concentration initiale (3,7 p. 100).

La concentration en azote lourd dans la coproporphyrine et protoporphyrine libre des hématies, à la fin de l'incubation, est du même ordre de grandeur que dans le glycocolle ajouté au sang. Ceci indique que la quantité de ces pigments synthétisés au cours de l'incubation est très supérieure à la quantité primitivement présente dans les globules rouges. Cette observation est en faveur de l'utilisation de ces substances pour la synthèse de l'hémoglobine.

ÉTUDE DES ACTIVATEURS ET INHIBITEURS.

La méthode d'incubation avec le glycocolle du sang de Lapin préalablement rendu anémique par le phénylhydrazine, se prête particulièrement bien à l'étude des effecteurs des systèmes enzymatiques catalysant la biosynthèse de la protoporphyrine. C'est d'ailleurs par cette méthode que nous avons constaté l'action activatrice de la vitamine B₁₂ et de l'acide folique (voir p. 29).

L'acide adénosinetriphosphorique et le mélange de l'acide adénylique et de l'acide α -cétooglutarique se sont également révélés des activateurs de la synthèse (BÉNARD, GAJDOS et GAJDOS-TÖRÖK, 1951 *a*). Il semble donc, que la synthèse de la protoporphyrine nécessite la présence de groupements phosphate labiles riches en énergie.

Il nous semblait intéressant de comparer les cinétiques de la biosynthèse protoporphyrinique en aérobiose et en anaérobiose. Nous avons donc incubé le sang du Lapin anémique avec du glycocolle en présence et en l'absence de l'oxygène. Dans ce dernier cas, nous avons maintenu le milieu d'incubation dans une atmosphère d'azote, additionnée de 5 p. 100 de CO₂ (BÉNARD, GAJDOS et GAJDOS-TÖRÖK, 1952 *b*).

Dans ces conditions, la coproporphyrine s'accumulait d'une façon considérable dans les globules rouges alors que la concentration en protoporphyrine libre restait très faible. Par contre en présence d'oxygène le taux de la protoporphyrine globulaire néoformée était nettement supérieur à celui de la coproporphyrine.

TABLEAU X.

	Incubation de 10 cm ³ de sang avec 50 mg de glycocolle		
	Avant incubation	Après 24 h d'incubation en milieu oxygéné	Après 24 h d'incubation en atmosphère azotée
Coproporphyrine.....	12	212	370
Protoporphyrine.	25	210	98
Coproporphyrine.....	10	340	990
Protoporphyrine.	30	652	112
Les concentrations sont indiquées en μg /100 cm ³ d'hématies.			

Comme le montre le tableau X, la somme des taux de la coproporphyrine et de la protoporphyrine libre dans les globules rouges reste sensiblement identique lorsque le sang de la même provenance est incubé soit en aérobiose, soit en atmosphère d'azote. Mais en l'absence d'oxygène, la réaction oxydative, transformant la coproporphyrine en protoporphyrine est ralentie, ce qui aboutit à l'accumulation du premier pigment aux dépens du second.

Ce fait constituait un nouvel argument en faveur du rôle intermédiaire, déjà envisagé, de la coproporphyrine au cours de la biosynthèse protoporphyrinique.

Nous avons étudié ensuite l'effet de plusieurs inhibiteurs biochimiques, l'acide malonique, le cyanure de potassium, l'acide monoïodacétique, le novarsénobenzol et le fluorure de sodium, aux cours de nos expériences d'incubation (BÉNARD, GAJDOS et GAJDOS-TÖRÖK, 1951 a).

L'acide malonique inhibe fortement la néoformation de la protoporphyrine. Ce fait ne peut étonner puisque nous savons depuis les recherches de SHEMIN, que la synthèse porphyrinique nécessite l'intervention du cycle de KREBS.

Le cyanure de potassium exerce également une action inhibitrice, ainsi que l'acide monoïodacétique. L'action de cette dernière substance semble apporter un nouvel argument en faveur de l'intervention de processus de phosphorylations au cours de la synthèse. L'arrêt de celle-ci sous l'effet du novarsénobenzol indique la nature sulfhydrylique des systèmes enzymatiques en jeu. Nous résumons dans le tableau XI quelques résultats numériques :

TABLEAU XI.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Sang en cm ³	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Glycocolle en mg.	25	25	25	25	25	25	25	25	25
A.T.P. en mg.		30	120						
A. α -cétoglutarique + A.M.P.				30 10					
Acide malonique mg.....					22				
KCN en mg.						0,9			
Ac. minoïodacét. mg.....							5		
Novarsénobenzol mg.....								5	
NaF en mg.									35
Protoporphyrine en μ g /100 cm ³ ...	100	200	280	370	24	20	20	20	448

L'augmentation très forte du taux de la protoporphyrine globulaire libre, sous l'action du fluorure de sodium, dans nos expériences faites avec du sang de Lapin, est inattendue, d'autant plus que d'autres chercheurs ont noté son effet inhibiteur sur la synthèse de l'hème au cours de son incubation avec des globules rouges du Poulet.

Il était séduisant d'expliquer ces observations discordantes par une différence d'espèce, mais nous avons pu constater qu'il suffisait de rendre le Poulet anémique, pour que son sang se comporte vis-à-vis du fluorure de sodium comme le sang du Lapin intoxiqué par la phénylhydrazine (BÉNARD, GAJDOS et GAJDOS-TÖRÖK, 1953 *b*).

Nous avons pensé, alors, que c'est l'intoxication phénylhydrazinique qui est le facteur responsable de l'effet particulier du fluorure de sodium. Mais l'anémie provoquée chez le Lapin ou chez le Poulet par saignées répétées reproduisait le même phénomène, il semblait donc que nous devions incriminer l'état anémique. Cette hypothèse a été de nouveau contredite par nos observations expérimentales : nous avons en effet constaté une augmentation du taux de la protoporphyrine globulaire libre lors de l'incubation du sang périphérique du Lapin normal avec du glyocolle en présence de fluorure de sodium (BÉNARD, GAJDOS et GAJDOS-TÖRÖK, 1957). Devant ces résultats expérimentaux, nous avons émis l'hypothèse qu'il ne s'agissait pas d'un effet activateur du fluorure de sodium sur la synthèse de la protoporphyrine, mais d'un blocage au niveau de la formation de l'hème, ce qui implique l'accumulation de la protoporphyrine libre.

TABLEAU XII.

	1	2	3	4	5
Sang en cm ³	25	25	25	25	25
Glyocolle en mg.....	—	125	125	125	125
Radioactivité en μ c.....	—	(12,5)	(12,5)	(12,5)	(12,5)
Fluorure de sodium en mg...	—	—	—	150	150
Après incubation de 4 heures à 37°					
Protoporphyrine libre en μ g/ 100 cm ³ d'hématies	687	1 535	1 300	6 225	6 475
Protoporphyrine libre c.p.m./ mg	—	64 000	67 513	66 713	67 666
Protoporphyrine hémoglobini- que c.p.m./mg.	—	457	464	105	115
Données hématologiques : globules rouges = 2.800.000, Hb = 67 p. 100 Réticulocytes = 17 p. 100. Protoporphyrine libre = 650 μ g /100 cm ³ hématies					

(GRINSTEIN, KAMEN et MOORE, 1948). Dans toutes ces expériences de contrôle, la protoporphyrine isolée en fin d'incubation était exempte de toute radioactivité.

Nous avons répétés ces expériences en présence de fer radioactif (^{59}Fe) et de glycocolle non marqué (BÉNARD, GAJDOS et GAJDOS-TÖRÖK, 1958 *a*). Ces dernières expériences, comme le montre le tableau XIII nous ont permis d'établir d'une façon encore plus directe, que le fluorure de sodium inhibait l'incorporation du fer dans la protoporphyrine.

Ce tableau montre en effet que la synthèse de la protoporphyrine libre se maintient, malgré la présence du fluorure de sodium dans le milieu et se traduit par un taux environ 10 fois supérieur en fin d'incubation à celui trouvé au début de l'expérience. En revanche, la synthèse de l'hème est presque entièrement suspendue par le fluorure de sodium jugée par la radioactivité de l'hème isolé en fin d'incubation. La radioactivité est en effet plus de 100 coups par minute et par mg d'hème en l'absence de fluorure de sodium et moins de 10 coups en présence de cet inhibiteur.

Une conclusion pratique de ces observations était la mise en évidence de la synthèse de l'hème par le sang périphérique du Lapin normal.

La réalité de cette synthèse nous a été déjà indiquée par nos observations antérieures (voir p. 27, tabl. II).

Lors de l'incubation, avec du glycocolle, du sang de Lapin normal, nous avons en effet observé une augmentation légère du taux de la protoporphyrine libre, mais à cette époque nous avons été incapable d'interpréter ce phénomène, en contradiction avec les observations de SHEMIN et ses collaborateurs. Comme l'adjonction du fluorure de sodium au milieu d'incubation augmente d'une façon considérable le taux de la protoporphyrine globulaire libre, nous avons pensé que le sang de Lapin normal synthétisait bien l'hème, mais que cette synthèse était noyée par la masse hémoglobinique. Par contre, le blocage de l'incorporation de la protoporphyrine libre dans la molécule hémoglobinique et partant la hausse évidente de son taux fournit la preuve indirecte de la biosynthèse de l'hème par les globules rouges du Lapin normal.

La validité de cette conclusion a été confirmée par nos expériences faites à l'aide des substances radioactives (BÉNARD, GAJDOS et GAJDOS-TÖRÖK, 1957).

Nous avons incubé pendant 4 heures à 38°, 50 cm³ de sang de Lapin *normal* avec 250 mg de glycocolle marqué par le carbone radioactif (^{14}C) dans son groupement méthylénique correspondant à 25 μC . L'état normal de nos Lapins a été contrôlé par la numération globulaire, le dosage de l'hémoglobine et de la protoporphyrine globulaire libre. En fin d'incubation, nous avons isolé, comme dans nos expériences précédentes, d'une part la protoporphyrine libre des globules rouges, et d'autre part la protoporphyrine hémoglobinique et mesuré leur radioactivité spécifique.

Comme le montre le tableau XIV, nous avons observé, en présence de fluorure de sodium, une augmentation très importante de la quantité de protoporphyrine libre, dont la radioactivité témoignait de son origine synthétique. Par contre, dans les mêmes incubats, la protoporphyrine isolée de l'hème fut entièrement dépourvue de radioactivité.

TABLEAU XIV.

N°	Protoporphyrine globulaire libre		Protoporphyrine hémoglobinique
	Quantité synthétisée en 4 heures (mg /100 cm ³ d'hématies)	c/mn/mg	c/mn/mg
Incubation en présence de fluorure de sodium			
1.....	0,597 0,617	4060 3340	néant néant
2.....	0,465 0,492	3720 3900	néant néant
Incubation en l'absence de fluorure de sodium			
1.....	0,119 0,107	2350 1800	15 14
2.....	— 0,117 0,122	2550 2300	14 17

En l'absence de fluorure de sodium, l'augmentation du taux de la protoporphyrine libre, pour moins importante que précédemment, était cependant manifeste, avec une radioactivité qui fournit ici encore la preuve de sa synthèse. La différence s'explique facilement si l'on admet qu'en l'absence de fluorure une grande partie de la protoporphyrine synthétisée est passée à l'état d'hème. En fait, comme le montre le tableau XIV, la protoporphyrine, isolée de l'hémoglobine dans ces dernières conditions, s'est montrée significativement radioactive.

Les globules rouges du Lapin normal nous paraissent donc capables de synthétiser non seulement la protoporphyrine libre, mais également l'hème. La synthèse hémoglobinique par les hématies du Lapin, préalablement rendu anémique par saignée ou par la phénylhydrazine, ne représente ainsi qu'une majoration importante d'un phénomène physiologique.

Nos expériences *in vitro* montrent donc l'activité inhibitrice du fluorure de sodium sur l'incorporation du fer dans la molécule porphyrinique. Nous nous sommes demandé si cette action s'observait également *in vivo* conduisant à une anémie.

Pour répondre à cette question, nous avons soumis des Lapins à une intoxication chronique par le fluorure de sodium en leur administrant tous les 2 à 3 jours, pendant 3 à 4 semaines, 60 mg/kg de ce toxique par sonde gastrique. L'étude hématologique de nos animaux a montré l'installation d'une anémie, manifeste déjà 48 à 72 heures après la première dose toxique et s'accroissant relativement peu par la suite. Le nombre des réticulocytes s'est élevé progressivement pour atteindre, au bout de 10 à 15 jours d'intoxication, 12 à 18 p. 100. Nous avons noté également une légère hausse du taux

de la protoporphyrine globulaire libre. Mais le fait le plus intéressant est le caractère hypochrome et hypersidéropasmatique de cette anémie. La valeur globulaire subit en effet, une baisse légère, mais nette, alors que le fer plasmatique est très élevé au bout de 3 semaines d'intoxication (BÉNARD, GAJDOS et GAJDOS-TÖRÖK, 1958 c).

Le tableau XV reproduit les données hématologiques chez quelques-uns de nos Lapins.

TABLEAU XV.

N° du Lapin	Jours et mois (1958)	Globules rouges en millions/mm ³	Hb p. 100	Valeur globulaire	Réticulo-cyt. p. 100 hématies	Fer sériq. en µg pour 100 cm ³	Protop. gl. l. µg /100 cm ³
64	24-1*	4,410	84	0,96	2		35
	27-1	3,140	54	0,85			
	31-1	2,920	51	0,85	10		
	3-2	3,090	51	0,82			
	5-2	2,766	40	0,71			
	7-2	2,720	45	0,83	18		
	11-2	2,650	46	0,87	18	296	76
68	11-2*	4,620	87	0,94	1,5		52
	14-2	3,590	67	0,93	6		
	17-2	3,680	65	0,90	7		
	19-2	3,520	62	0,88	10		
	21-2	3,100	52	0,84	13		
	24-2	3,140	51	0,81	12		
	26-2	3,130	54	0,85	13,8	420	96
69	11-2*	4,800	89	0,93	2		53
	14-2	3,620	69	0,95	7		
	17-2	3,600	65	0,90	9		
	19-2	3,480	61	0,87	11		
	21-2	3,380	54	0,80	14		
	24-2	3,330	52	0,77	13		
	26-2	3,300	54	0,82	13	400	100

* Immédiatement avant l'administration de la première dose de fluorure de sodium.

On a observé, à la suite de l'introduction buccale des doses élevées de fluorure de sodium, des hémorragies du tube digestif. Une pareille éventualité aurait pu intervenir, au cours de nos expériences, dans le déterminisme de l'anémie. Nous avons donc repris nos études en administrant cette fois au Lapin le fluorure de sodium par voie intraveineuse à la dose de 20 à 30 mg par kg tous les 3 jours pendant 4 semaines. Les résultats hématologiques se sont révélés pratiquement comparables à ceux observés au cours de nos expériences précédentes. Comme le montre le tableau XVI, nous avons noté, en effet, une anémie avec une baisse de 25 p. 100 environ du nombre des globules rouges et du taux de l'hémoglobine, une légère mais nette réticulocytose, une hypersidérémie importante, une hausse de la protoporphyrine globulaire libre. En revanche, la valeur globulaire est restée égale à l'unité

pendant toute la durée de l'expérience. Nous n'avons décelé aucune trace d'hémorragie cutanée ou muqueuse.

TABLEAU XVI.

N°	Jours et mois 1958	Globules rouges en millions / mm ³	Hb	Valeur globulaire	Fer sérique µg	Protoporphyrine globulaire libre µg
76	Immédiatement avant l'intoxication :					
	24-11	4,310	83	0,96		40
	1-12	4,120	80	0,99		58
	8-12	3,900	78	1,00		70
	15-12	3,700	76	1,00		109
	22-12	3,580	75	1,00	275	84
78	Immédiatement avant l'intoxication :					
	26-11	4,450	84	0,95		64
	3-12	3,980	79	0,99		92
	10-12	3,620	75	1,0		99
	17-12	3,500	70	1,0		69,9
	23-12	3,420	69	1,0	240	57,7
79	Immédiatement avant l'intoxication :					
	27-11	4,700	89	0,95		53,5
	4-12	4,400	85	0,95		102,5
	11-12	4,080	80	1,0		116,5
	23-12	3,700	74	1,0	362	63,8

Nous pouvons donc considérer que l'administration de fluorure de sodium détermine, chez le Lapin, une anémie hypersidérémique, non hyperchrome, avec augmentation du taux de la protoporphyrine libre des érythrocytes. Ces caractères s'expliquent aisément par l'action inhibitrice du fluorure de sodium sur l'incorporation du fer dans la protoporphyrine. Le fer et la protoporphyrine non utilisés pour la synthèse de l'hémoglobine s'accumulent ainsi. On conçoit également l'absence d'hyperchromie malgré la sidérémie élevée.

Pour vérifier la validité de cette hypothèse *in vivo*, nous avons sacrifié nos animaux au bout de trois ou quatre semaines d'intoxication et nous avons incubé leur sang avec du glycolle marqué dans son groupement méthylénique par le ¹⁴C ou bien en présence de ⁵⁹Fe et de glycolle non marqué (BÉNARD, GAJDOS et GAJDOS-TÖRÖK, 1958 a).

Les tableaux XVII et XVIII résument les données numériques de deux de ces expériences.

Comme au cours de nos expériences précédentes, nous avons incubé 25 cm³ de sang avec 125 mg de glycolle, présentant 12,5 µc de radioactivité ou bien avec 2 µg de fer (⁵⁹Fe) correspondant à 0,4 µc. Dans les expériences faites avec le glycolle radioactif, nous avons dosé le taux de la protoporphyrine libre et déterminé après purification sa radioactivité ainsi que celle de la protoporphyrine hémoglobinique cristallisée. Dans les expériences faites

avec le ^{59}Fe , nous avons dosé également la protoporphyrine globulaire libre pour vérifier l'augmentation de son taux, d'autre part nous avons isolé et cristallisé l'hémine sous forme de chlorhydrate d'hémine pour la détermination de sa radioactivité.

TABLEAU XVII. — Incubation du sang de Lapin intoxiqué par le fluorure de sodium.

	Numéro des fioles d'incubation		
	1	2	3
Sang * en cm ³	25	25	25
Glycocolle radioactif en mg		125	125
Radioactivité en μc		(12,5)	(12,5)
Après 4 heures d'incubation			
Protoporphyrine libre des hématies en μg pour 100 cm ³	70	180	178
Radioactivité de la protoporphyrine libre (c.p.m. /mg)		4 074	4 299
Radioactivité de la protoporphyrine hémoglobinique (c.p.m. /mg).....		20	23
* Données hématologiques : globules rouges : 3 510 000 ; hémoglobine = 57 p. 100, valeur globulaire = 0,81, réticulocytes = 17 p. 100, fer sérique = 200 μg , protoporphyrine globulaire libre = 71 μg pour 100 cm ³ d'hématies.			

Comme le montre le tableau XVII, le taux de la protoporphyrine globulaire libre augmente de plus de 100 p. 100 au cours de l'incubation et présente une radioactivité hautement significative, tandis que la radioactivité de la protoporphyrine hémoglobinique est très faible (20 à 25 coups/m/mg) en comparaison avec celle que présente le même pigment après incubation de sang de lapin non intoxiqué par le fluorure de sodium.

L'inhibition de la synthèse de l'hème ne peut donc s'expliquer que par le défaut de la combinaison du fer avec la molécule porphyrinique.

Ce fait ressort encore mieux des expériences faites en présence du fer radioactif et résumées dans le tableau XVIII, où la radioactivité de l'hème est insignifiante malgré l'augmentation nette du taux de la protoporphyrine libre globulaire, témoin du maintien de la synthèse de ce dernier pigment.

Ces résultats expérimentaux montrent donc que le fluorure de sodium inhibe *in vivo* comme *in vitro* l'incorporation du fer dans la molécule protoporphyrinique. Cette action inhibitrice permet d'interpréter, tout au moins en partie, les caractères hématologiques de l'anémie expérimentale déterminée par ce toxique.

L'anémie provoquée par le fluorure de sodium est comparable en beaucoup de points à celle déterminée par le plomb. L'apparition d'une anémie et l'augmentation considérable du taux de la protoporphyrine globulaire libre au cours du saturnisme sont en effet des notions classiques.

TABLEAU XVIII. — Incubation du sang de Lapin intoxiqué par le fluorure de sodium.

	Numéro des fioles d'incubation			
	1	2	3	4
Sang * en cm ³	25	25	25	25
Glycocolle en mg	—	125	125	125
Fer radioactif (⁵⁹ Fe) en µg	—	2	2	2
(radioactivité en µc)		(0,4)	(0,4)	(0,4)
Après 4 heures d'incubation.				
Protoporphyrine globulaire libre en µg pour 100 cm ³	96	177		
Radioactivité de l'hémine en c.p.mn/mg..			7,12	8,0
* Données hématologiques : globules rouges = 3 720 000 ; hémoglobine = 65 p. 100 ; valeur globulaire = 0,87 ; réticulocytes = 13 p. 100 ; fer sérique = 350 µg ; proto- porphyrine globulaire libre = 64 µg.				

Quant au mécanisme pathogénique de cette anémie, plusieurs chercheurs l'ont expliqué par l'effet inhibiteur du plomb sur l'utilisation du fer pour la synthèse de l'hémoglobine. A la suite d'expériences fondées sur les méthodes isotopiques, VANNOTTI et DELACHAUX (1942), RIMINGTON (1951) ont vérifié le bien-fondé de cette manière de voir. GOLDBERG et ses collaborateurs (1956) confirment encore récemment, par la même technique, ces observations, mais ils pensent que le plomb exerce également une action inhibitrice au niveau de la formation de l'acide δ-aminolévulinique, précurseur des porphyrines.

Nous avons repris ce problème au cours des expériences *in vivo* chez le Lapin (BÉNARD, GAJDOS et GAJDOS-TÖRÖK, 1958 b).

Des Lapins normaux adultes ont reçu tous les cinq jours, 100 mg de plomb par kg de poids, sous forme d'acétate neutre de plomb. Lorsque l'anémie est devenue manifeste, avec une réticulocytose semblable à celle que nous obtenions habituellement par l'intoxication phénylhydrazinique, les animaux ont été saignés et le sang incubé, soit avec du fer radioactif (⁵⁹Fe) soit avec du glycocolle marqué par ¹⁴C. Nous avons mesuré la radioactivité spécifique de la protoporphyrine globulaire libre et de l'hème isolés en fin d'incubation.

Nous avons inscrit dans le tableau XIX les résultats d'une expérience faite en présence de glycocolle radioactif.

Comme on le voit, le sang de Lapin intoxiqué par le plomb est pratiquement incapable de synthétiser l'hème. La radioactivité de la protoporphyrine, isolée de l'hémoglobine en fin d'incubation, est en effet pratiquement nulle. Cette absence de synthèse est bien due à un défaut d'incorporation du fer dans la protoporphyrine, puisque la néoformation de ce dernier pigment est maintenue, comme l'indique la radioactivité spécifique très significative de la protoporphyrine globulaire libre. La synthèse de la protoporphyrine est pourtant relativement faible. Sa radioactivité est en effet très

TABLEAU XIX. — *Incubation du sang de Lapin intoxiqué par le plomb.*

	Numéro des fioles d'incubation				
	1	2	3	4	5
Sang * en cm ³	25	26	25	25	25
Glycocolle marqué en mg. Radioactivité en µc.	—	125 (12,5)	125 (12,5)	125 (12,5)	125 (12,5)
Fluorure de sodium en mg.	—	—	—	150	150
Protoporphyrine libre en µg 100 cm ³ d'hématies..	174	443	431	490	510
Protoporphyrine globulaire libre c.p.m. /mg.	—	27 000	21 000	18 000	21 000
Protoporphyrine hémoglo- bine c.p.m./mg.	—	Nombre non différen- ciable du nombre de base		Nombre de base	

* Données hématologiques au moment de la saignée : globules rouges = 3 700 000 ;
hémoglobine = 80 p. 100 ; réticulocytes = 18 p. 100.

inférieure à celle que présente ce pigment après incubation du sang de Lapin traité par la phénylhydrazine. D'autre part, le fluorure de sodium ne détermine aucune augmentation du taux de la protoporphyrine libre par rapport à celui relevé en l'absence de fluorure de sodium. Avec le sang de Lapin phénylhydraziné (voir tabl. XII, p. 36), l'adjonction de fluorure fait passer, en fin d'incubation, la teneur du sang en protoporphyrine libre de 1 400 μ g / 100 cm³ d'hématies à 6 300 μ g. Par contre avec le sang de Lapin intoxiqué par le plomb, la teneur des érythrocytes en protoporphyrine reste pratiquement la même en présence et en l'absence de fluorure : 500 à 430 μ g (tabl. XIX). Le ralentissement de la synthèse de la protoporphyrine par les globules rouges du Lapin intoxiqué par le plomb est dû probablement à l'effet inhibiteur de ce métal sur la synthèse de l'acide δ -aminolévulinique, comme l'indique les expériences de GOLDBERG et coll. (1956).

L'inhibition de la combinaison du fer avec la protoporphyrine au cours de l'incubation du sang de Lapin porteur d'une anémie saturnine est également confirmée par l'emploi du fer radioactif. Comme le montre le tableau XX, la radioactivité de l'hémine isolée en fin d'expériences, est en effet très peu marquée : 14,8 coups/minute/mg par rapport à 109 coups/minute/mg (voir tabl. XIII, p. 37).

Nous nous sommes demandé, si l'on retrouve le même effet inhibiteur du plomb dans les expériences, où ce métal est ajouté au moment même de l'incubation au sang du Lapin préalablement intoxiqué par la phénylhydrazine.

Mais on doit remarquer que le plomb, ajouté au sang de Lapin anémique, inhibe également la formation de la protoporphyrine et que l'absence de la radioactivité de l'hémine, telle que le montre le tableau XXI, est due à cette inhibition de la synthèse protoporphyrinique.

Nous avons en effet constaté nous-mêmes (L. PECORA, GAJDOS et GAJDOS-TÖRÖK 1955), ce dernier effet inhibiteur du plomb, dont le tableau suivant donne quelques exemples :

TABLEAU XXII.

N° de fiole d'incubation	1	2	3	4	5	6
Sang de lapin anémique cm ³ .	10	10	10	10	10	10
Glycocolle en mg.....	—	50	50	50	50	50
Acétate de plomb en mg....	—	—	0,1	0,01	0,001	0,0001
Protoporphyrine libre des globules après 8 heures d'incubation à 37° en µg / 100 cm ³ d'hématies.....	90	559	93	110	216	317

Comme le montre le tableau XXII, l'inhibition de la synthèse de la protoporphyrine par le plomb nécessite une concentration relativement élevée de ce toxique. A la concentration de 10^{-4} la synthèse du pigment est pratiquement arrêtée, alors que celle-ci n'est que faiblement diminuée lorsque la concentration du plomb se trouve entre 10^{-5} et 10^{-6} . A la concentration employée au cours des expériences résumées dans le tableau XXI (10^{-3}), le métal peut donc arrêter la synthèse de la protoporphyrine. L'absence de la radioactivité dans ces dernières expériences ne peut donc être objectivement attribuée à l'inhibition de la combinaison du fer avec la protoporphyrine.

JANDL et ses collaborateurs (1959) ont encore tout récemment montré, à l'aide de radiochromatogramme, l'effet inhibiteur du plomb sur la combinaison du fer radioactif avec la protoporphyrine.

L'anémie provoquée chez le Lapin soit par l'intoxication saturnine, soit par l'intoxication fluorée, montre de nombreux caractères semblables : hypersidérémie, absence d'hyperchromie, augmentation du taux de la protoporphyrine globulaire libre. Dans les deux cas, nous avons pu mettre en évidence l'action inhibitrice du toxique sur l'incorporation du fer dans la molécule protoporphyrinique.

L'intoxication du Lapin par l'oxyde de carbone, semble déterminer une anémie présentant les mêmes caractères hématologiques. PECORA et ses collaborateurs (1957) ont récemment rapporté en effet, chez le Lapin, soumis à une intoxication prolongée par l'oxyde de carbone, la production d'une anémie hypochrome et hypersidéroplassmatique, accompagnée d'une hyperprotoporphyrine globulaire.

Nous avons repris ces expériences (GAJDOS et GAJDOS-TÖRÖK, 1958).

TABLEAU XXIII.

N°	Jours et mois (1958)	Globules rouges en millions/mm ³	Hb p. 100	Valeur globulaire	Réticulo- cytes en p. 100	Globules blancs p. mm ³	Fer sérique μg
64	18.2 *	4,166	82	0,99	1,5	5 200	304
	26.2	3,640	70	0,96	4,5	6 000	
	3.3	3,410	61	0,98	5,5	5 720	
66	28.2 *	4,420	87	0,90	1,1	5 230	360
	13.3	3,600	67	1,0	5	5 040	
	20.3	3,630	67	0,91	5,6	4 400	
	24.3	3,500	61	0,87	6,5	4 520	
67	28.2 *	4,210	80	0,98	1,3	4 850	350
	11.3	3,650	70	0,96	4,5	4 760	
	20.3	3,360	58	0,84	5,2	4 800	

* Avant l'intoxication oxycarbonée.

Pour obtenir une anémie par intoxication chronique oxycarbonée, nous avons maintenu nos Lapins tous les jours, pendant 2 à 3 heures, dans un caisson de métal hermétiquement fermé, mais permettant, par deux tuyaux de caoutchouc, l'arrivée continu d'oxygène et d'oxyde de carbone. Le

TABLEAU XXIV. — Incubation du sang de Lapin intoxiqué par l'oxyde de carbone.

	Numéro des fioles d'incubation			
	1	2	3	4
Sang * en cm ³	25	25	25	25
Glycocolle en mg.....	—	125	125	125
Fer radioactif (⁵⁹ Fe) en μg.....	—	2	2	2
Radioactivité en μc.....		(0,4)	(0,4)	(0,4)
Après 4 heures d'incubation à 37°.				
Protoporphirine globul. libre en g/100 cm ³ d'hématies.....	60	120		
Radioactivité de l'hémine c.p.m. / mg.....	—	—	16,3	16,5

* Données hématologiques du sang incubé : globules rouges = 3 400 000 Hb. = 71 p. 100 ; réticulocytes = 5,5 p. 100 ; fer sérique = 304 μg.

d'une part du sang de Lapin préalablement intoxiqué par la phénylhydrazine, et d'autre part, du même sang saturé par l'oxyde de carbone immédiatement avant l'incubation.

Comme le montre le tableau XXV, l'oxyde de carbone diminue dans ces conditions également la synthèse de l'hème par inhibition de l'utilisation du fer.

En fin d'incubation, les deux échantillons de l'hémine isolée du sang saturé d'oxyde de carbone présentent une radioactivité de 32,9 et de 29,7 c.p.m./mg, alors que la radioactivité de l'hémine isolée du sang non oxycarboné est presque quatre fois plus élevée (122 et 112 c.p.m./mg). Cette baisse de la synthèse n'est pas due à un manque de protoporphyrine, puisque ce pigment continue à être néoformé quoique à un degré moindre que dans le sang non saturé par l'oxyde de carbone.

Nos expériences montrent donc que les trois substances toxiques étudiées : fluorure de sodium, plomb et oxyde de carbone, sont capables, de déterminer chez le Lapin une anémie hypochrome avec hypersidéroplassmie, hyperprotoporphyrurie globulaire et réticulocytose élevée.

D'autre part, l'adjonction de ces substances au sang de Lapin préalablement intoxiqué par la phénylhydrazine, empêche *in vitro* la néoformation de l'hème par inhibition de la combinaison fer-protoporphyrine, alors que la synthèse de la protoporphyrine se maintient à un niveau assez élevé. Nous avons fait les mêmes constatations lors de l'incubation du sang de Lapin préalablement intoxiqué par le plomb, le fluorure de sodium ou l'oxyde de carbone.

2. APTITUDE DE DIVERS ORGANES A RÉALISER LES ÉTAPES DE LA BIOSYNTHÈSE DE LA PROTOPORPHYRINE ET L'ACTION DES EFFECTEURS BIOCHIMIQUES SUR CES ÉTAPES

Comme nous l'avons mentionné, les porphyrines n'ont pas de lieu de formation électif dans l'organisme. La plupart des tissus sont en effet capables de synthétiser les pigments tétrapyrroliques, aussi bien à partir des précurseurs primitifs (glycocolle, acide acétique) qu'à partir des composés intermédiaires (acide δ -aminolévulinique, porphobilinogène).

Dans la première série de nos expériences nous avons étudié d'une part cette capacité de divers organes et tissus de synthétiser les porphyrines en les incubant soit avec l'acide δ -aminolévulinique, soit avec le porphobilinogène. Nous avons ensuite dans une deuxième série d'expériences, observé l'action de différents effecteurs biochimiques sur cette synthèse.

Les incubations étaient pratiquées à partir d'homogénats d'organes obtenus par broyage des organes de Lapin ou de Rat avec du sérum physiologique, ou bien avec des extraits aqueux des tissus en présence de 250 à 300 μ g d'acide δ -aminolévulinique (8) pendant 6 heures à pH 7,6 et à 37°.

En fin d'expérience, nous avons dosé dans le milieu d'incubation le taux

(8) Nous remercions vivement le Pr NEUBERGER qui a bien voulu mettre à notre disposition de l'acide δ -aminolévulinique synthétisé dans son laboratoire.

J. Physiologie, 1959, 51. Suppl. 1 (GAJDOS-TÖRÖK).

du porphobilinogène, de l'uroporphyrine, de la coproporphyrine et de la protoporphyrine.

Dans ces conditions expérimentales nous avons pu mettre en évidence la synthèse des porphyrines dans tous les organes étudiés, sauf dans le muscle périphérique. Le tableau XXVI montre les résultats concernant le foie, le rein et les testicules (GAJDOS et GAJDOS-TÖRÖK, 1955 a).

TABLEAU XXVI.

N° du récipient	1	2	3	4	5	6
Extrait hépatique	+	+				
Extrait rénal.....						
Extrait testiculaire.....					+	+
Ac. δ -aminolévulinique en μ g.		250		250		250
Porphobilinogène en μ g.....	0	160	0	120	0	150
Uroporphyrine en μ g.....	0	traces	0	traces	0	traces
Coproporphyrine et Protoporphyrine en μ g.....	0,90	8,7	0,30	2,2	0,2	2,7
Chaque fiole renferme une quantité d'extrait correspondant à 2 g d'organe frais. Volume final : 10 cm ³ . Incubation pendant 6 heures, à 37° et à pH = 7,6.						

Le foie est l'organe le plus actif. La transformation en protoporphyrine se fait si rapidement qu'après une incubation de quelques heures, nous trouvons seulement très peu de porphobilinogène et des traces d'uroporphyrines dans le milieu.

Les résultats sont un peu différents avec la rate. La transformation complète en protoporphyrine est réalisée, mais plus lentement que sous l'effet d'un extrait hépatique ou rénal et l'on retrouve en fin d'incubation une quantité relativement élevée de porphobilinogène, d'uro- et de coproporphyrines.

L'extrait pulmonaire agit encore autrement. La synthèse aboutit essentiellement à la formation de porphobilinogène et d'uroporphyrine et il se forme seulement une petite quantité de porphyrines éthérosolubles (copro- et protoporphyrine) comme le montre le tableau XXVII.

TABLEAU XXVII.

N° du récipient	1	2	3	4
Extrait splénique.....	+	+		
Extrait pulmonaire.....			+	+
Ac. δ -aminolévulinique en μ g....		300		300
Porphobilinogène en μ g.....	0	40	0	80
Uroporphyrine en μ g.....	0	19,8	0	6,5
Copor. + Protoporphyrines en μ g.	0,20	10,0	0,65	1,8

Ces observations confirment entièrement celles de GIBSON, NEUBERGER et SCOTT, (1954) qui ont montré la répartition large dans l'organisme de Lapin, de l'enzyme appelé par ces auteurs acide δ -aminolévulinique-déhydrase, catalysant la condensation de l'acide δ -aminolévulinique en porphobilinogène.

Nous avons d'autre part observé, que les homogénats des divers organes de Lapin ou de Rat synthétisent les porphyrines également à partir du porphobilinogène (GAJDOS et GAJDOS-TÖRÖK, 1955 c).

Le porphobilinogène a été préparé sous forme cristallisée selon la technique de WESTALL (1952), modifiée par RIMINGTON et ses collaborateurs (9), à partir des urines de Lapins préalablement intoxiqués par administration quotidienne, par sonde gastrique, d'un gramme d'allylisopropylacétamide ou allylisopropylacétylcarbamide (sédormide) (SCHMID et SCHWARTZ, 1952 ; GOLDBERG, 1953). Dans ces conditions, il se produit une véritable porphyrine aiguë, caractérisée biologiquement par une élimination urinaire massive de porphobilinogène et d'uroporphyrine.

300 μ g de porphobilinogène ont été incubés à $pH = 7,6$ et 37° avec des homogénats de tissus et nous avons dosé en fin d'incubation les produits de transformation successive du chromogène (uro-, copro-, et protoporphyrines).

C'est encore le foie qui s'est révélé l'organe le plus actif, réalisant rapidement la synthèse porphyrinique jusqu'à son stade ultime : la protoporphyrine.

La synthèse en présence de tissu rénal est qualitativement comparable à celle qu'on observe en présence du tissu hépatique, mais la quantité de protoporphyrine formée en fin d'incubation est plus faible.

Il en est de même en ce qui concerne le tissu splénique et la muqueuse intestinale.

Après incubation du porphobilinogène avec l'un de ces quatre tissus (foie, rein, testicule, muqueuse intestinale) nous n'avons pu déceler dans le milieu la présence d'uroporphyrines. Le précurseur monopyrrolique s'est transformé jusqu'à l'étape de copro- et surtout de protoporphyrine.

Il en est tout autrement au cours des incubations avec le tissu pulmonaire. Dans ces cas c'est au contraire l'uroporphyrine qui se trouve en concentration la plus élevée en fin d'incubation, alors que la quantité de la protoporphyrine néoformée est nettement plus faible. Le tableau XXVIII donne des exemples de ces observations expérimentales.

Il est intéressant de signaler que la capacité du foie de synthétiser la protoporphyrine est partiellement conservée même lorsque le tissu hépatique est le siège d'une dégénérescence graisseuse, déterminée par l'administration de tétrachlorure de carbone. Nous retrouvons en effet dans ces conditions la synthèse de la copro- et de la protoporphyrine à partir du porphobilinogène, mais la concentration de la protoporphyrine néoformée est relativement faible. En revanche, le tissu rénal prélevé sur ces animaux, intoxiqués par le tétrachlorure de carbone, synthétise la protoporphyrine à un taux très élevé, comme si le rein exerçait une fonction vicariante de ce point de vue par rapport au tissu hépatique profondément endommagé (tabl. XXIX).

(9) Communication personnelle.

TABLEAU XXVIII.

Organe	Période expérimentale avant ou après incubation	Uropor- phyrine μg	Copropor- phyrine μg	Protopor- phyrine μg
Foie.....	avant après	0 0	0 1,53	0,37 7,86
Rein.....	avant après	0 0	0 1,16	0,48 4,49
Rate.....	avant après	0 0	0 0,72	0,13 2,79
Muqueuse intestinale...	avant après	0 0	0 0,81	0,47 2,28
Poumon.....	avant après	0 9,2	0 1,21	0,30 6,14
Muscle périphérique ...	avant après	0 0	0 0	traces traces

TABLEAU XXIX.

Organe	Période expérimentale avant ou après incubation	Uropor- phyrine μg	Copropor- phyrine μg	Protopor- phyrine μg
Foie.....	avant après	0 0	0 1,88	1,12 2,80
Rein	avant après	0 0	0 2,59	1,95 10,09

Comme l'acide δ-aminolévulinique-déhydrase, le système enzymatique catalysant la transformation du porphobilinogène en porphyrines est extractible par l'eau comme le montre le tableau XXX.

Cette extractibilité aqueuse de ces deux systèmes enzymatiques rend très aisée l'étude de leurs effecteurs biochimiques.

En étudiant une préparation d'acide δ-aminolévulinique-déhydrase purifiée, GIBSON et coll. (1954) ont observé la nature sulfhydrylique de cet enzyme, dont l'action se trouve fortement activée par le glutathion réduit et par la cystéine. Nos expériences confirment cette nature sulfhydrylique de l'enzyme, que nous avons trouvé fortement inhibé par le novarsénobenzol. Nous avons également noté l'action inhibitrice du cyanure de potassium ce qui indique que la formation du porphobilinogène à partir de l'acide δ-aminolévulinique est liée à une réaction oxydative (GAJDOS et GAJDOS-TÖRÖK, 1955 b).

TABLEAU XXX.

Condition expérimentales	Uroporphyrine μg	Corprophyrine μg	Protoporphyrine μg
Extrait aqueux incubé sans porphobilinogène.....	0	0	0,70
Extrait aqueux incubé avec 300 μg de porphobilinogène	0	3,6	22,0
Extrait aqueux incubé avec 300 μg de porphobilinogène	0	3,0	17,0
300 μg de porphobilinogène incubés seuls.	traces	0	0
Incubation d'un extrait aqueux de 2 g de foie de Lapin avec 300 μg de porphobilinogène pendant 6 heures à 37° et à pH = 7,6.			

L'effet du cyanure de potassium et celui du novarsénobenzol sont bien illustrés par le tableau XXXI :

TABLEAU XXXI.

N° du récipient	1	2	3	4	5
Extrait hépatique.....	+				
Acide δ -aminolévulinique.....		+	+	+	+
KCN M /200				+	
Novarsénobenzol M /100.....					+
Porphobilinogène en μg	0	0	200	70	traces
Uroporphyrine en μg	0	0	traces	0	0
Copro + Protoporphyrines en μg	0,9	0	6,5	1,0	2,0
Chaque fiole renferme une quantité d'extrait hépatique correspondant à 2 g de foie frais, 300 μg d'acide δ -aminolévulinique. Incubation pendant 6 heures à 37° à pH = 7,6.					

L'acide malonique, l'acide α -cétoglutarique, l'acide adénosinemonophosphorique et à un degré plus faible l'acide adénosinetriphosphorique exercent également un effet inhibiteur sur l'acide δ -aminolévulinique-déshydrase.

Le fluorure de sodium et l'acide monoïodacétique se révèlent également des inhibiteurs de l'enzyme, alors que le phloridzozide se comporte en activateur.

L'enzyme catalysant la condensation du porphobilinogène en porphyrines est également inhibé par le cyanure de potassium et le novarsénobenzol comme le montre le tableau XXXIV qui rend également compte de l'action inhibitrice de l'atmosphère d'azote au cours de l'incubation.

TABLEAU XXXII.

N° du récipient	1	2	3	4	5
Extrait hépatique.....	+	+	+	+	+
A. δ -aminolévulinique 300 μ g.....	+	+	+	+	+
Acide malonique M /100.....					
Ac. α -cétoglutarique M /100.....			+	+	
ATP M /100.....				+	
AMP M /100.....					
Porphobilinogène en μ g.....	220	140	traces	130	10
Uroporphyrine en μ g.....	1,5	0	0	0	0
Copro- + Protoporphyrine en μ g....	6,9	0	1,0	3,9	1,1

TABLEAU XXXIII.

N° du récipient	1	2	3	4
Extrait hépatique..	+	+	+	+
A. δ -aminolévulinique 300 μ g.	+	+	+	+
Fluorure de sodium M/50....		+		
Phloridzotide M /200.....			+	
Ac. monoiodacétique M /100..				+
Porphobilinogène en μ g.....	200	150	200	traces
Uroporphyrine en μ g.....	2,2	0	2,24	0
Copro- + Protoporphyrine en μ g.....	8,67	4,1	12,5	1,3

TABLEAU XXXIV

Conditions expérimentales	1	2	3	4	5	6
2 g d'homogénat de foie de Lapin.....	+		+	+	+	+
250 μ g de porphobilinogène		+	+	+	+	+
Atmosphère d'azote.....				+		
KCN M/200.....					-	
Novarsénobenzol.....						+
Uroporphyrine en μ g....	0	0	0	traces	1,35	0
Coproporphyrine en μ g...	0	0	1,65	0,60	0	0
Protoporphyrine en μ g. ..	0,20	0	24,0	0,22	0,20	1,10

L'acide malonique, l'acide α -cétoglutarique et l'acide adénosinetriphosphorique ont également une action inhibitrice nette. L'acide adénosine-monophosphorique, inhibiteur de l'acide δ -aminolévulinique-déhydrase active au contraire fortement la formation des porphyrines à partir du porphobilinogène (tabl. XXXV).

TABLEAU XXXV.

Conditions expérimentales	1	2	3	4	5	6	7
2 g d'homogénat de foie. 250 μ g de porphobilinog. Acide malonique M/200. Ac. α -cétoglut. M/200... ATP 30 mg/10 cm ³ AMP 10 mg/10 cm ³	+	+	+	+	+	+	+
Uroporphyrine en μ g. ...	0	0	0	0	0	0	1,99
Coproporphyrine en μ g. .	0	0	2,4	0	1,50	0	5,17
Protoporphyrine en μ g.	0,23	0	9,4	0,40	0,90	2,93	27,84

L'action du fluorure de sodium, du phloridzoside et de l'acide monoïodacétique est intéressante pour la comparaison de l'acide δ -aminolévulinique-déhydrase et du système enzymatique de la transformation du porphobilinogène. La première, comme nous l'avons vu, est inhibée par le fluorure de sodium et l'acide monoïodacétique et activée par le phloridzoside. Ce dernier effecteur agit de la même façon sur le deuxième enzyme, mais celui-ci n'est pratiquement pas inhibé par le fluorure de sodium et il se trouve même activé par l'acide monoïodacétique (tabl. XXXVI). Ces observations expérimentales peuvent étonner. Le phloridzoside et l'acide monoïodacétique

TABLEAU XXXVI.

Conditions expérimentales	1	2	3	4	5	6
2 g d'homogénat de foie..... 250 μ g porphobilinogène..... Fluorure de Na M/50..... Phloridzoside M/200..... Ac. monoïodacet. M/100.....		+	+	+	+	+
Uroporphyrine en μ g.....	0	0	0	0	0	0
Corproporphyrine en μ g.....	0	0	3,45	3,20	5,0	4,0
Protoporphyrine en μ g.....	0,25	0	6,05	5,75	18,7	16,9

sont des inhibiteurs des enzymes sulfhydryliques dont font partie nos deux enzymes étudiés. On pourrait évoquer la complexité du système biologique dont nous avons étudié l'action enzymatique. Signalons néanmoins que Granick a récemment retrouvé les effets opposés de l'acide monoiodacétique sur l'acide δ -aminolévulinique-déhydrase et sur l'enzyme responsable de la transformation du porphobilinogène, les deux enzymes se trouvant à l'état très purifié dans les expériences de cet auteur.

Le tableau XXXVII, où nous avons réuni l'action des divers effecteurs étudiés sur l'acide δ -aminolévulinique-déhydrase et le système enzymatique transformant le porphobilinogène, montre le comportement rapproché mais non identique de ces deux enzymes :

TABLEAU XXXVII.

Effecteurs	Synthèse du porphobilinogène à partir de l' α -aminolévulin.	Synthèse des porphyrines à partir du porphobilinogène
Cyanure de potassium.....	Inhibition	Inhibition
Novarsénobenzol.....	Inhibition	Inhibition
Acide malonique	Inhibition	Inhibition
Ac. α -cétoglutarique	Inhibition	Inhibition
ATP	Inhibition	Inhibition
AMP	Inhibition	Activation
Fluorure de sodium	Inhibition	Pas d'inhibition
Acide monoiodacétique.....	Inhibition	Activation
Phloridzotide	Activation	Activation

Tout récemment, on a pu obtenir à l'état très purifié l'acide δ -aminolévulinique-déhydrase et le système enzymatique catalysant la transformation du porphobilinogène, et vérifier leur comportement vis-à-vis des effecteurs biochimiques. Nous reviendrons sur les données de ces expériences (voir p. 66) qui confirment en grande partie nos observations personnelles résumées plus haut.

3. ÉTUDE DU SYSTÈME ENZYMATIQUE CATALYSANT L'INCORPORATION DU FER DANS LA PROTOPORPHYRINE

GOLDBERG et ses collaborateurs (1956) ont montré la nature enzymatique de l'incorporation du fer dans la molécule protoporphyrinique au cours de la biosynthèse de l'hémoglobine. Tout récemment, GOLDBERG (1958) a obtenu, à partir des globules rouges de Poulet, une préparation enzymatique réalisant *in vitro*, en présence du fer radioactif et de la protoporphyrine, la synthèse de l'hème.

Nous avons étudié cet enzyme tout d'abord avec les globules rouges de Poulet, suivant la technique de GOLDBERG (1958) (voir p. 23). Pour l'incubation, 3 à 7 cm³ de la préparation enzymatique sont additionnés de 2 à 3 μ g de ⁵⁹FeCl₃ (0,2 à 0,3 μ c) et de 300 μ g de protoporphyrine cristallisée. (La protoporphyrine est dissoute dans du bicarbonate de sodium N/7 et la

solution est ajustée à pH 7,4 par HCl 2N). La fiole d'incubation est complétée à 10 cm³ par la solution de tampon tris à pH 7,4. Chaque expérience a été pratiquée en double.

Après incubation à 37° pendant 4 heures, on ajoute, à titre d'entraîneur, à chaque fiole 25 cm³ d'un hémolysat de globules rouges renfermant 0,1 M de cyanure de potassium et on cristallise l'hémine. On procède à des recristallisations jusqu'à constance du nombre de coups par minute. La radioactivité est déterminée à l'aide d'un compteur à scintillation.

Nous exprimons le degré d'incorporation du fer dans la protoporphyrine par le nombre des coups par minute rapporté au mg de protoporphyrine cristallisée ajoutée au milieu d'incubation.

L'étude de notre préparation enzymatique obtenue à partir du sang de Poulet confirme entièrement les observations de GOLDBERG.

Comme le montre en effet le tableau XXXVIII, 7 cm³ de la préparation enzymatique incubés avec 300 µg de protoporphyrine et de 3 µg de ⁵⁹FeCl₃, réalisent la synthèse de l'hème, alors que celle-ci est nulle en absence de l'enzyme. Nous avons également noté, comme l'a déjà signalé GOLDBERG, l'effet activateur de l'acide ascorbique, ajouté au milieu d'incubation à la concentration de 5. 10⁻⁵ M.

TABLEAU XXXVIII.

	Fioles témoins protoporphyrine + ⁵⁹ Fe		Fioles contenant protoporphyrine + ⁵⁹ Fe + enzyme		Fioles contenant protoporphyrine + ⁵⁹ Fe + enzyme + Ac. ascorbique	
	1	2	3	4	5	6
Coups par mn et par mg de protoporphyrine ajoutée au milieu d'incubation		nombre de base	5 024	4 990	7 000	7 100

Nous avons pu confirmer, d'autre part, les observations de GOLDBERG mettant en évidence la nature enzymatique de la combinaison du fer à la protoporphyrine dans les conditions de ses expériences. Nous n'avons pas observé en effet la formation de l'hème lors de l'incubation du fer radioactif et de la protoporphyrine en présence d'une préparation enzymatique préalablement chauffée. D'autre part, la solubilisation parfaite de la protoporphyrine dans une solution de détergent (Teepol) n'a pas permis la combinaison spontanée, non enzymatique, du pigment avec le fer radioactif.

TABLEAU XXXIX.

	Fioles témoins protoporphyrine + ⁵⁹ Fe		Fioles contenant protoporphyrine + ⁵⁹ Fe + enzyme		Fioles contenant protoporphyrine + ⁵⁹ Fe + enzyme + désoxycholate de sodium	
	1	2	3	4	5	6
Coups par mn et par mg de protoporphyrine ajoutée au milieu d'incubation		nombre de base	2 015	2 045	2 818	2 880

Par la suite, nous avons observé la présence de l'enzyme dans les globules rouges de Lapin préalablement intoxiqué par la phénylhydrazine. Dans ce cas, l'obtention de la préparation enzymatique est plus laborieuse qu'à partir des globules rouges du Poulet. Elle est facilitée par l'adjonction de désoxycholate de sodium au stroma globulaire à raison de 7 mg pour 100 cm³. Le tableau XXXIX montre l'activité enzymatique des globules rouges d'un Lapin, qui a présenté au moment de la saignée une réticulocytose à 35 p. 100.

L'activité enzymatique n'est nullement proportionnelle à la richesse du sang de Lapin en réticulocytes. Comme le montre le tableau XL, cette activité est encore très nette, lorsque la préparation enzymatique est obtenue à partir du sang de Lapin ayant une réticulocytose à 3,8 p. 100.

TABLEAU XL.

	Fioles témoins protoporphyrine + ⁵⁹ Fe		Fioles contenant protoporphyrine + ⁵⁹ Fe + enzyme	
	1	2	3	4
Coups par minute et par mg de protoporphyrine ajoutée au milieu d'incubation.....	nombre de base		1 820	1 820

Au cours de nos expériences antérieures (voir p. 49), nous avons noté que le plomb, le fluorure de sodium et l'oxyde de carbone inhibaient l'incorporation du fer dans la protoporphyrine au cours de la biosynthèse de l'hème.

Il nous a semblé intéressant d'étudier l'effet de ces inhibiteurs sur notre préparation enzymatique.

L'acétate de plomb (30 mg pour 10 cm³) empêche entièrement la synthèse de l'hème (tabl. XLI).

TABLEAU XLI.

	Incubation de l'enzyme extrait de sang de Lapin			
	en absence de plomb		en présence de plomb	
	1	2	3	4
Coups par minute et par mg de protoporphyrine ajoutées au milieu d'incubation.....	3 330	3 340	nombre de base	

Le fluorure de sodium, ajouté au mélange d'incubation à raison de 60 mg pour 10 cm³, n'exerce qu'une action inhibitrice partielle :

TABLEAU XLII.

	Incubation avec l'enzyme extrait de sang de Poulet		Incubation avec l'enzyme extrait de sang de Lapin	
	En absence de fluorure	En présence de fluorure	En absence de fluorure	En présence de fluorure
Coups par minute et par mg de protoporphyrine ajou- tée au milieu d'incubation.	5 024	3 012	2 015	1 982

En revanche, l'oxyde de carbone n'a exercé aucun effet inhibiteur sur nos préparations enzymatiques.

Nous avons étudié le vieillissement de notre préparation enzymatique, qui gardée à 0° perd son activité presque complètement au bout de 10 jours. GOLDBERG conserve son extrait à -10° et constate une forte diminution de l'activité après 3 semaines.

En nous inspirant des travaux de GABRIO et coll. (1956) qui ont observé l'action protectrice de l'inosine et de l'adénosine sur la survie des globules rouges dans le sang conservé, nous avons étudié l'effet de ces substances sur notre préparation enzymatique.

Dans ce but, nous avons ajouté à cette préparation de l'inosine ou de l'adénosine à la concentration de 15 μM par cm^3 . Nous avons noté l'effet activateur de ces deux bases puriques et la prolongation de l'activité du système enzymatique conservé à 0°.

DISCUSSION

I. — ÉTUDE DE LA PROTOPORPHYRINE LIBRE DES ÉRYTHROCYTES

Les érythrocytes des mammifères renferment une très petite quantité (une cinquantaine de μg pour 100 cm^3 d'hématies) de protoporphyrine à l'état libre.

Son origine a prêté à discussion. On pouvait en effet envisager qu'elle provient de la dégradation de l'hémoglobine qui renferme le même pigment dans son groupement prosthétique. Le taux constant et très faible de cette protoporphyrine globulaire libre d'une part et tout ce que nous savons d'autre part de la dégradation du pigment sanguin dans l'organisme, se sont inscrits contre cette hypothèse. On a donc été amené à envisager l'origine synthétique de la protoporphyrine globulaire libre et nous avons pu en donner toute une série d'arguments expérimentaux :

C'est ainsi que nous avons remarqué que lors de l'incubation avec le glycolle des globules rouges de Lapin préalablement rendu anémique soit par la phénylhydrazine, soit par saignées répétées, le taux de la protoporphyrine libre augmente d'une façon considérable. Or, cette augmentation obéit aux mêmes conditions que la biosynthèse de l'hémoglobine, étudiée dans le même milieu à l'aide de la technique isotopique par l'école de RITTENBERG et de SHEMIN : indépendance du nombre des réticulocytes, absence d'augmentation du taux protoporphyrinique lors de l'incubation de sang humain à 37°, très faible augmentation lorsqu'on procède à l'incubation du sang de Lapin normal, aucun enrichissement en protoporphyrine libre des globules rouges du Lapin anémique incubés à 0°.

D'autre part, nous avons constaté au cours de l'incubation avec du glycolle du sang de Lapin anémié, l'apparition d'une quantité d'abord croissante des uro- et de coproporphyrines, dont le taux baissait ensuite au fur et à mesure qu'augmentait la quantité de la protoporphyrine globulaire libre.

Or, les expériences de RITTENBERG et SHEMIN ont montré déjà que ces deux pigments (copro- et uroporphyrine) représentaient des intermédiaires au cours de la formation de la protoporphyrine. (Comme nous l'avons déjà dit, les vrais intermédiaires sont les chromogènes correspondants, dont l'uro- et la coproporphyrine représentent les produits d'oxydation.)

Des arguments encore plus directs en faveur de l'origine synthétique de la protoporphyrine globulaire libre ont été apportés au cours de nos expériences destinées à étudier l'action de l'acide folique et de la vitamine B₁₂ sur l'évolution du taux de la protoporphyrine globulaire libre au cours de l'incubation, en présence de glycocolle, du sang de Lapin anémique. Ces expériences nous ont montré l'action activatrice très nette de ces deux vitamines. Nous avons noté par la suite, que la vitamine B₁₂ et l'acide folique augmentent également *in vivo* chez le Lapin, d'une façon très significative, le taux de la protoporphyrine globulaire libre.

Ces derniers résultats nous ont fourni un moyen d'étudier l'origine de la protoporphyrine globulaire libre *in vivo*.

Comme le glycocolle représente un précurseur obligatoire au cours de la synthèse porphyrinique, nous avons pensé que le blocage partiel ou total de la réserve glycollique chez le Lapin par l'administration de benzoate de sodium — qui s'élimine par les urines sous forme de sa combinaison avec le glycocolle (acide hippurique) — s'opposera à l'augmentation du taux de la protoporphyrine globulaire libre sous l'action de la vitamine B₁₂ ou de l'acide folique.

Nous avons donc injecté au Lapin deux grammes de benzoate de sodium et le lendemain, soit 15 mg d'acide folique, soit 20 µg de vitamine B₁₂. Dans ces conditions et contrairement à ce qui se passe lorsque l'une de ces deux substances seule est administrée, nous n'avons observé aucune augmentation du taux globulaire de la protoporphyrine libre.

Nos contre-expériences ont apporté une preuve encore plus directe.

Chez le Lapin, préalablement traité par le benzoate de sodium, nous avons pu rétablir la hausse de la protoporphyrine par l'acide folique ou la vitamine B₁₂, en injectant à l'animal, en même temps que ces deux vitamines, un gramme de glycocolle.

Ces expériences ont déjà fortement plaidé en faveur de l'origine synthétique de la protoporphyrine globulaire libre. Nous avons pu apporter un argument encore plus décisif en procédant à l'incubation avec le glycocolle marqué par l'azote lourd (¹⁵N) du sang de Poulet (10). Dans ces conditions la protoporphyrine, isolée en fin d'incubation, a renfermé l'azote lourd à une concentration significative.

L'ensemble de nos observations expérimentales ne laisse donc aucun doute sur l'origine synthétique de la protoporphyrine libre des globules rouges.

Notre conclusion a été récemment reprise par GRANICK (1947). Au cours de ses magnifiques recherches sur les systèmes enzymatiques qui interviennent dans la biosynthèse porphyrinique, cet auteur a utilisé, comme témoin de

(10) Le sang du Poulet *normal*, synthétise, comme nous l'avons déjà dit, l'hème, lors de son incubation avec le glycocolle.

la synthèse, l'augmentation du taux de la protoporphyrine libre dans le milieu d'incubation.

Nos expériences, surtout celles que nous avons entreprises à l'aide des isotopes radioactifs et sur lesquelles nous reviendrons, ont montré que la protoporphyrine globulaire libre non seulement ne provenait pas de la dégradation de l'hémoglobine, mais qu'au contraire elle était utilisée au cours de la biosynthèse du pigment sanguin. Cette conclusion a permis d'interpréter les modifications du taux globulaire de la protoporphyrine libre au cours des diverses anémies.

La nature synthétique de la protoporphyrine globulaire libre ayant été établie, il nous semblait intéressant d'étudier la durée de temps pendant laquelle les globules rouges conservent *in vivo* la capacité de synthétiser le pigment.

Nous avons donc administré au Lapin, en une seule dose, 60 mg de phénylhydrazine et nous avons étudié dans des intervalles réguliers, pendant 40 jours, la synthèse de la protoporphyrine au cours de l'incubation des prises de sang en présence de glycocole.

Nous avons noté que la synthèse atteignait son maximum au bout de 8 jours environ après l'intoxication par la phénylhydrazine. Mais 40 jours après, alors que le nombre des réticulocytes est redevenu normal, la capacité de synthèse était encore très nette, puisque le taux du pigment, à la fin d'une incubation de 4 heures, était supérieur de 50 à 100 p. 100 à celui observé avant l'incubation.

Comme la survie des globules rouges chez le Lapin est environ une cinquantaine de jours, on peut affirmer que chez le Lapin anémique les globules rouges gardent leur capacité de synthétiser la protoporphyrine pendant toute la durée de leur survie.

L'origine synthétique de la protoporphyrine globulaire libre une fois établie, nous avons pu étudier *in vitro* l'action de certains effecteurs biochimiques sur cette synthèse.

Nous avons déjà mentionné nos observations concernant l'effet activateur de l'acide folique et de la vitamine B₁₂. Nous avons également noté que l'acide adénosine triphosphorique, l'acide adénylique, l'acide α -cétoglutarique et le fluorure de sodium agissaient de la même façon. Nous reviendrons sur cet effet activateur inattendu du fluorure de sodium.

D'autre part l'acide malonique, le cyanure de potassium, l'acide monoïodacétique et le novarsénobenzol se sont révélés, dans nos expériences, comme des inhibiteurs puissants de la synthèse de la protoporphyrine.

L'interprétation de l'effet des inhibiteurs ne peut être envisagée qu'avec la plus grande réserve, lorsqu'il s'agit des systèmes enzymatiques non isolés à l'état pur.

L'action de l'acide malonique se conçoit aisément, puisque l'on sait le passage obligatoire des précurseurs primitifs des porphyrines par le cycle tricarboxylique de KREBS.

L'inhibition par le cyanure de potassium semble indiquer l'existence d'une ou des étapes oxydatives au cours de la synthèse. L'oxydation intervient certainement au cours de la transformation de la coproporphyrine en protoporphyrine. D'ailleurs nos expériences ont montré qu'en l'absence d'oxygène,

la synthèse de la protoporphyrine *in vitro*, dans notre système d'incubation, s'arrêtait au stade de la coproporphyrine. Cette dernière observation qui présentait un intérêt biochimique à son moment, mettant en évidence le rôle intermédiaire de la coproporphyrine, a été confirmée par plusieurs auteurs.

L'effet inhibiteur de l'acide monoiodacétique et du novarsénobenzol plaide en faveur de l'intervention du ou des systèmes enzymatiques à nature sulphydrylique.

L'étude de l'action activatrice du fluorure de sodium s'est révélée au cours de nos expériences ultérieures très fructueuse. Elle a permis tout d'abord d'établir une curieuse différence entre les mécanismes de la biosynthèse de la protoporphyrine chez le Lapin et le Poulet.

Nous avons en effet observé que cet effecteur augmentait d'une façon considérable la synthèse de la protoporphyrine libre lors de l'incubation, avec le glyocolle, du sang de Lapin anémique ou du sang de Poulet anémique (soit par intoxication phénylhydrazinique, soit par saignées répétées).

En revanche, il existe une différence remarquable entre le sang de Lapin normal et le sang de Poulet normal, le fluorure de sodium agissant sur celui-ci comme inhibiteur et sur celui-là comme activateur. Nous reviendrons sur cette différence de comportement, dont RICHMOND, SALOMON et CAPLIN (1954) rapportent un autre exemple : effet activateur du fluorure de sodium sur la synthèse de l'hème par les nodules de racine de soja, effet inhibiteur sur la synthèse par la moelle osseuse du Lapin.

Nos expériences ultérieures, faites à l'aide des substances radioactives, nous ont permis d'établir que lors de l'incubation du sang de Lapin préalablement rendu anémique, l'augmentation du taux de la protoporphyrine globulaire libre en présence de fluorure de sodium n'est pas en réalité déterminée par une activation de la synthèse, mais par le blocage de la formation de l'hème aboutissant à l'accumulation de la protoporphyrine.

Lorsque nous avons incubé le sang de Lapin anémique avec du glyocolle marqué dans son groupement méthylénique par le ^{14}C , nous avons observé que la protoporphyrine libre isolée en fin d'incubation renfermait une radioactivité très significative, alors que la protoporphyrine isolée de l'hème en était pratiquement dépourvue.

Après l'incubation du même sang de Lapin anémique en présence de glyocolle non marqué et de fer radioactif (^{59}Fe), l'hémine isolée des globules rouges n'était pas significativement radioactive. Dans ces conditions, la protoporphyrine libre était naturellement, elle aussi, dépourvue de radioactivité, mais sa quantité élevée témoignait de son accumulation.

Le fluorure de sodium peut donc avoir deux points d'attaque au cours de son effet inhibiteur sur la biosynthèse de l'hème. Il peut, réduire la synthèse de la protoporphyrine. C'est le cas chez le Poulet normal. Il peut d'autre part, empêcher la combinaison de la protoporphyrine avec le fer. C'est le cas chez le Lapin normal ou anémié et chez le Poulet anémique. Ce blocage de l'incorporation du fer dans la protoporphyrine par le fluorure de sodium a été récemment confirmé par MINAKAMI et ses collaborateurs (60, 61, 1958 *a* et *b*). Sans pouvoir pour le moment l'expliquer, nous devons donc envisager la modification du comportement biochimique des globules rouges de Poulet sous l'action des agents anémiant mis en œuvre : phénylhydrazine ou sai-

gnées répétées. Tout au plus, peut-on invoquer les expériences récentes de GOSSELIN et POPJAK (45), qui ont noté au cours de leurs études sur le rôle des microsomes hépatiques dans la biosynthèse du cholestérol, que le fluorure de sodium augmentait la synthèse en présence des microsomes vieillies, alors qu'il était sans effet sur les microsomes jeunes. La différence d'action du fluorure de sodium sur les globules rouges du Poulet normal et du Poulet anémique repose-t-elle sur un état biochimique différent des microsomes dans les deux conditions expérimentales ? Nous n'avons pu jusqu'à maintenant aborder ce problème pour raison technique.

Nos observations sur l'effet de fluorure de sodium nous ont permis de mettre en évidence la réalité de la biosynthèse de l'hémoglobine par les globules rouges périphériques du Lapin normal.

Comme nous l'avons déjà mentionné, nos recherches ont montré l'utilisation de la protoporphyrine libre pour la synthèse du pigment sanguin. Nous avons donc pensé que si nous retrouvons au cours de l'incubation du sang de Lapin normal l'augmentation du taux de la protoporphyrine globulaire libre en présence du fluorure de sodium, nous serons autorisés de considérer ce phénomène comme le témoin de la synthèse hémoglobinique. Or cette accumulation de la protoporphyrine s'est vérifiée au cours de nos expériences. Mais ces résultats n'ont apporté qu'une preuve indirecte.

L'argument direct a été fourni par l'emploi des isotopes. Après incubation du sang de Lapin normal, soit avec le glyco-colle radioactif, soit avec le ^{59}Fe , nous avons constaté d'une façon certaine la synthèse faible, mais significative, de l'hème.

Ces expériences nous autorisent à envisager que la synthèse hémoglobinique intense par les globules rouges du Lapin, préalablement rendu anémique, n'est qu'une exagération d'un processus physiologique.

Le blocage de l'incorporation du fer dans la protoporphyrine par le fluorure de sodium, nous a également amené à étudier les caractères de l'anémie déterminée par administration de ce toxique. Cette anémie fluorée, signalée seulement par quelques auteurs (VALVÉJAC, 1932 ; RISI, 1931) a été assez peu étudiée.

Nous avons constaté, que le fluorure de sodium, introduit chez le Lapin soit par voie buccale, soit par voie intraveineuse, à la dose de 20 à 30 mg/kg de poids tous les deux jours, pendant 3 à 4 semaines, déterminait une anémie assez particulière, caractérisée par une hypersidérémie sans hyperchromie, par une hyperprotoporphyrine globulaire libre et par une réticulocytose pouvant atteindre 15 à 18 p. 100.

Nous avons noté par la suite, que le sang du Lapin rendu ainsi anémique est pratiquement incapable de réaliser, lors de son incubation avec le fer radioactif et le glyco-colle non marqué, la synthèse de l'hème. Nous retrouvons donc *in vivo* le même blocage de l'incorporation du fer dans la protoporphyrine par le fluorure de sodium que celui que nous avons observé *in vitro*. Ce point d'attaque précis du toxique explique les caractères de l'anémie qu'il provoque chez le Lapin. Le fer et la protoporphyrine libre s'accumulent faute d'utilisation pour la biosynthèse de l'hème, et on conçoit, en même temps, l'absence d'hyperchromie.

Nous nous sommes alors demandé si le blocage de l'incorporation du fer

dans la protoporphyrine se retrouve au cours d'autres anémies toxiques présentant les mêmes caractères hématologiques que l'anémie due à l'intoxication fluorée. (Hypersidérémie, hyperprotoporphyrurie globulaire, absence d'hyperchromie.) On sait depuis longtemps que ces caractères se retrouvent dans l'anémie qui accompagne le saturnisme expérimental. PECORA et ses collaborateurs (1957), ont rapporté récemment qu'il en est de même en ce qui concerne l'anémie provoquée chez le Lapin par l'intoxication oxycarbonée chronique.

Nous avons donc soumis le Lapin adulte à l'intoxication soit par l'acétate de plomb, soit par l'oxyde de carbone et nous avons noté, dans les deux cas, la production d'une anémie nettement hypersidérémique, orthochrome et souvent même hypochrome, accompagnée toujours d'une hyperprotoporphyrurie globulaire plus ou moins marquée.

L'incubation du sang des Lapins, rendus anémiques par ces toxiques, avec le glyocolle et le Fer radioactif (^{59}Fe), nous a permis de constater la diminution très nette de la synthèse de l'hème par inhibition de la combinaison du fer avec la protoporphyrine.

Nos expériences ont ainsi permis de mettre en évidence un mécanisme pathogénique précis et commun au cours de ces diverses anémies toxiques.

II. — SYNTHÈSE DES PORPHYRINES A PARTIR DE L'ACIDE δ -AMINOLÉVULINIQUE ET DU PORPHOBILINOGENE

Nous n'avons envisagé jusqu'à maintenant que la biosynthèse globale des porphyrines et de l'hème, réalisée à partir des précurseurs primitifs (glyocolle et acide acétique) par les cellules du système érythropoïétique, *in vitro* et *in vivo*.

Mais ce processus obéit aux grandes lois des synthèses dans l'organisme : réalisation par étapes successives, intervention de systèmes enzymatiques spécifiques à chaque étape. Comme nous l'avons déjà signalé, les recherches biochimiques de ces dernières années ont établi les suites des étapes intermédiaires, dont les principales peuvent être résumées de la façon suivante :

1. Formation de l'acide δ -aminolévulinique à partir de l'acide acétique et de glyocolle par l'intervention du cycle tricarboxylique de KREBS et de tous les systèmes enzymatiques qu'implique le fonctionnement de ce cycle ;

2. La condensation de deux molécules de l'acide δ -aminolévulinique en porphobilinogène, réaction catalysée par un enzyme spécial, l'acide δ -aminolévulinique-déshydrase ;

3. La formation à partir du porphobilinogène des porphyrines, réalisée elle-même par plusieurs étapes : porphobilinogène $\rightarrow$ uroporphyrinogène $\rightarrow$ coproporphyrinogène $\rightarrow$ protoporphyrine ;

4. L'incorporation du fer dans la protoporphyrine, catalysée par un enzyme adéquat.

Comme nous l'avons exposé dans le chapitre consacré à nos travaux personnels, nous avons pu étudier en quelques détails trois étapes différentes de la biosynthèse de l'hème :

1. la synthèse des porphyrines à partir de l'acide δ -aminolévulinique ;
2. la même synthèse à partir du porphobilinogène ;
3. l'incorporation du fer dans la molécule protoporphyrinique.

LA SYNTHÈSE PORPHYRINIQUE A PARTIR DE L'ACIDE δ -AMINOLÉVULINIQUE. L'ACIDE δ -AMINOLÉVULINIQUE-DÉHYDRASE.

L'acide δ -aminolévulinique-déhydrase est très largement distribuée dans la nature. Elle a été décrite par DRESEL et FALK (1953) dans les érythrocytes du Poulet. Par la suite, on a retrouvé l'enzyme dans les érythrocytes du Canard (SHEMIN et coll., 1954), dans le *Chlorella* (1955, *b*), dans les feuilles d'épinard (1955, *a*) dans différents micro-organismes. Fait intéressant, l'enzyme fait défaut dans la levure, capable pourtant de synthétiser les porphyrines.

Dans l'organisme des mammifères, l'acide δ -aminolévulinique-déhydrase semble être largement distribué parmi les divers organes. Chez le Lapin, GIBSON (1955) a trouvé sa présence dans le foie, dans le tissu rénal dans la moelle osseuse, dans la rate, dans le sang. L'enzyme est hydrosoluble. GIBSON, NEUBERGER et SCOTT (1954), SCHMID et SHEMIN (1955), GRANICK et MAUZERALL (1958, *a*), l'ont obtenu à l'état plus ou moins purifié à partir d'extrait d'organes aqueux de différentes provenances.

Nos propres recherches (voir p. 49) montrent également l'existence de cet enzyme dans les différents tissus de Lapin et de Rat : extraits hépatique, rénal, testiculaire, pulmonaire. Nous avons noté, comme GIBSON, que le tissu hépatique était le plus actif parmi les organes étudiés.

Les expériences que nous avons pu faire avec un certain nombre d'effecteurs chimiques ont montré l'action inhibitrice du novarsénobenzol, confirmant la nature sulfhydrylique de l'enzyme, déjà établie par d'autres voies par GIBSON (1955). Nous avons également noté l'action inhibitrice de l'acide malonique, de l'acide α -cétoglutarique, de l'acide monoiodacétique et, à un moindre degré, de l'acide adénosinetriphosphorique et du fluorure de sodium, alors que le phloridzozide s'est révélé comme un activateur. L'action inhibitrice de l'acide monoiodacétique a été antérieurement signalée par GIBSON (1955). L'effet inhibiteur de l'acide α -cétoglutarique noté dans nos expériences, a été par la suite confirmé par GRANICK et MAUZERALL (1958, *a*) lors de l'étude d'une préparation de l'acide δ -aminolévulinique-déhydrase très purifié. Ces auteurs ont également rapporté qu'au cours de la transformation de l'acide δ -aminolévulinique en porphobilinogène, l'acide adénosinetriphosphorique n'intervenait pas. Nos propres expériences indiquent même son effet inhibiteur à ce stade.

L'action inhibitrice du fluorure de sodium observée dans nos expériences est intéressante, puisque, comme nous l'avons déjà vu (voir p. 54), cette substance conduit, lors de l'incubation des érythrocytes du Lapin avec le glycocolle, à une accumulation de la protoporphyrine. Ces observations peu-

vent être mises en parallèle avec celles d'ERIKSEN (1955) qui constate l'action inhibitrice du plomb sur l'acide δ -aminolévulinique-déhydrase, alors que l'intoxication par cette substance détermine une hyperprotoporphyrurie globulaire en général très élevée.

Nos expériences confirment donc la large répartition de l'acide δ -aminolévulinique-déhydrase parmi les organes des mammifères, sa nature sulfhydrylique et apportent quelques attributions personnelles, confirmées par la suite, sur l'action de certains effecteurs biochimiques.

SYNTHÈSE DES PORPHYRINES A PARTIR DU PORPHOBILINOGENE LA PORPHOBILINOGENASE.

Cet enzyme, comme l'acide δ -aminolévulinique-déhydrase, est largement répandu dans la nature. Il a été mis en évidence dans les érythrocytes d'Oiseaux (FALK, DRESEL et RIMINGTON, 1953), dans le chlorella (BOGORAD, 1955), dans les plantes (germe de blé, feuille de haricot, de tournesol). Les deux enzymes ont encore en commun le caractère d'extractibilité par l'eau. BOGORAD (1958) a obtenu récemment la porphobilinogénase à partir de feuilles d'épinard sous forme d'une préparation très purifiée.

Par l'incubation du porphobilinogène pur avec des extraits ou d'homogénats de divers tissu de Lapin et de Rat, nous avons pu mettre en évidence la vaste distribution de la porphobilinogénase dans l'organisme.

Nous avons en effet noté la rapide transformation en protoporphyrine du porphobilinogène incubé en présence du tissu hépatique, rénal, splénique, pulmonaire et de la muqueuse intestinale. Comme pour l'acide δ -aminolévulinique-déhydrase, c'est le foie qui semble être le plus actif. Cette activité enzymatique est nettement diminuée, lorsque le tissu hépatique est le siège de lésions histologiques importantes.

L'étude des effecteurs nous a permis de noter la grande similitude entre les caractères biologiques des deux enzymes, l'acide δ -aminolévulinique-déhydrase et la porphobilinogénase. Mais nous avons été frappés par leur comportement différent vis-à-vis de l'acide monoiodacétique. Celui-ci inhibe, comme nous l'avons dit, l'acide δ -aminolévulinique-déhydrase, alors que cette inhibition fait défaut vis-à-vis de la porphobilinogénase. Ces observations ont été récemment confirmées par GRANICK et MAUZERALL (1958 *b*) d'une part et par BOGORAD (1958) d'autre part.

Les travaux tout récents de RIMINGTON et LOCKWOOD (1957), de MAUZERALL et GRANICK (1958) et de BOGORAD (1958) ont mis en évidence plusieurs systèmes enzymatiques catalysant la transformation du porphobilinogène en protoporphyrine par l'intermédiaire de l'uroporphyrinogène et du coproporphyrinogène.

Nos propres expériences, antérieurs à ces travaux, semblent montrer que les différents organes des mammifères (Lapin et Rat) ne sont pas munis de la même façon de ces divers systèmes enzymatiques.

En étudiant la formation des porphyrines lors de l'incubation du porphobilinogène pur avec les extraits d'organes, nous avons en effet noté que le tissu pulmonaire synthétisait surtout de l'uroporphyrine, alors que tous les autres organes, que nous avons étudiés, réalisaient dans ces conditions

la synthèse jusqu'à l'étape de la portoporphyrine. Ces expériences semblent donc montrer que le poumon, en opposition avec les autres tissus, ne renferme qu'à une concentration relativement faible les enzymes nécessaires à la transformation de l'uroporphyrinogène en coproporphyrinogène et de celui-ci en protoporphyrine.

RIMINGTON (70) (11) a observé également une différence de comportement de ce point de vue entre certains organes.

III. — ÉTUDE DU SYSTÈME ENZYMATIQUE CATALYSANT L'INCORPORATION DU FER DANS LA PROTOPORPHYRINE

GOLDBERG et ses collaborateurs (1956) ont récemment constaté la nature enzymatique de la combinaison du fer avec la protoporphyrine pour former l'hème. GOLDBERG (1958) a isolé à partir du stroma des érythrocytes du Poulet une préparation enzymatique, qui mise en présence de fer radioactif (^{59}Fe) et de protoporphyrine pure, a réalisé la synthèse de l'hème. Nos expériences ont entièrement confirmé celles de cet auteur.

Par la même technique, nous avons pu mettre en évidence la présence de l'enzyme dans les érythrocytes dépourvus de noyau (hématies du Lapin préalablement intoxiqué par la phénylhydrazine) (GAJDOS-TÖRÖK et coll., 1959).

L'incorporation du fer dans la protoporphyrine peut s'opérer spontanément. HEICKEL, LOCKWOOD et RIMINGTON (1958) ont en effet noté que le fer des sels ferreux se combinait à la protoporphyrine *in vitro*, à condition d'assurer la solubilité parfaite par l'adjonction d'un détergent (teepol) ou de globine naturelle.

La formation de l'hème, dans nos expériences, fait-elle réellement appel à l'intervention d'un système enzymatique ? Une réponse affirmative est déjà autorisée par les observations de GOLDBERG qui a noté l'absence de la synthèse lors de l'emploi d'une préparation enzymatique préalablement chauffée, observations que nous avons nous-même confirmées. Nos expériences ont permis d'apporter un argument supplémentaire. Après avoir mis en présence le chlorure ferrique radioactif ($^{59}\text{FeCl}_3$), une solution de protoporphyrine pure et un détergent (teepol), nous n'avons constaté, au bout de 4 heures d'incubation, aucune formation d'hème.

Nous avons également étudié l'effet de trois substances toxiques sur l'activité de la préparation enzymatique obtenue à partir du stroma des érythrocytes de Poulet : le plomb, le fluorure de sodium et l'oxyde de carbone. L'étude de ces trois toxiques s'est imposée à nous à cause de leur action *in vivo* sur l'hémoglobino-génèse. Comme nous avons déjà mentionné (p. 49), nous avons d'une part déterminé chez le Lapin par administration d'une de ces trois substances, une anémie hypersidérémique mais non hyperchrome, d'autre part nous avons constaté leur action inhibitrice *in vivo* et *in vitro* sur l'incorporation du fer radioactif dans la protoporphyrine.

Or, d'après nos expériences, le plomb, le fluorure de sodium et l'oxyde de

(11) Communication personnelle.

J. Physiologie, 1959, **51**, Suppl. 1 (GAJDOS-TÖRÖK).

carbone n'agissent pas de la même façon sur la préparation enzymatique de GOLDBERG mise en présence de fer radioactif et de protoporphyrine.

Alors que le premier de ces toxiques exerce une inhibition des plus nettes, évaluée par l'absence de l'hème radioactif néoformé, cette inhibition est relativement faible avec le fluorure de sodium et totalement absente en atmosphère d'oxyde de carbone.

Ces expériences semblent indiquer que malgré l'apparence de l'identité d'action de ces toxiques chez l'animal entier ou en présence des érythrocytes intacts, en réalité une grande différence existe en ce qui concerne leur lieu d'attaque, différence que masque la complexité d'une cellule vivante.

L'enzyme du stroma érythrocytaire, catalysant l'incorporation du fer dans la protoporphyrine semble être assez fragile. Dans nos expériences, la préparation enzymatique obtenue suivant la technique de GOLDBERG et maintenu à 0°, perd son activité en deux semaines environ. Conservée à -10°, la préparation perd beaucoup de son activité au bout de 3 semaines (GOLDBERG, 1958).

Les travaux de GABRIO, FINCH et HUENNEKENS (1956) mettant en évidence l'action favorable de l'inosine et de l'adénosine sur la conservation du sang destiné à des transfusions, nous ont amenés à étudier l'effet de ces deux substances sur une éventuelle prolongation de la durée d'activité de la préparation enzymatique de GOLDBERG.

Nos expériences ont montré que l'adjonction de l'inosine ou de l'adénosine à la préparation enzymatique à la concentration de 15 $\mu\text{Mol/cm}^3$ prolongeait très significativement la « survie » de l'enzyme.

Ces expériences semblent indiquer que le maintien de l'activité enzymatique est lié aux processus de phosphorylation et probablement à la néoformation de l'acide adénosinetriphosphorique, grâce au maintien de la glycolyse sous l'action de l'inosine ou de l'adénosine. C'est en effet par ce mécanisme que FINCH et ses collaborateurs expliquent l'action de l'inosine sur la prolongation de survie des globules rouges conservés.

Comme l'ont mis en évidence les recherches récentes, la biosynthèse de l'hème est une suite de nombreuses réactions très complexes. Il est impressionnant de constater que des érythrocytes peuvent réaliser *in vitro* en un laps de temps très court toutes les réactions qui conduisent à partir des molécules simples du glycocolle et de l'acide acétique au groupement prosthétique si complexe du pigment sanguin.

Si les grandes lignes des étapes intermédiaires et des caractères biochimiques des enzymes qui interviennent au cours de ces étapes sont déjà connues, il reste sans doute une grande œuvre à réaliser pour élucider complètement le mécanisme de la biosynthèse de l'hème. Tout porte à croire que cette œuvre, en plus de son importance biochimique, apportera des connaissances d'un grand intérêt pratique, notamment dans le domaine de la pathologie et du traitement de certaines anémies.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

Après un bref rappel historique des travaux concernant la biosynthèse de l'hème, nous avons exposé les étapes biochimiques de cette synthèse telles qu'elles ressortent des récents travaux. Les porphyrines sont formées à partir du glycocolle et de l'acide acétique, qui conduisent d'abord à l'acide δ -aminolévulinique. Deux molécules de cette dernière substance se condensent en un dérivé monopyrrolique, le porphobilinogène, dont quatre molécules se réunissent en un cycle fermé, correspondant à l'uroporphyrine. Par décarboxylation et oxydation, celle-ci se transforme en copro- puis en protoporphyrine. Ce dernier pigment enfin, forme, par incorporation du fer, l'hème. Ces différentes étapes sont catalysées par des systèmes enzymatiques spécifiques.

Après un résumé des techniques employées au cours de nos travaux, nous avons exposé en quelques détails les résultats de nos recherches personnelles.

Ces recherches que nous avons effectuées pendant les dix dernières années, ont suivi pas à pas l'évolution du problème de la biosynthèse de l'hème. Fondées sur les techniques et les données expérimentales les plus récentes, elles ont apporté un certain nombre de faits nouveaux, confirmés rapidement par d'autres chercheurs.

Pour raison de clarté nous avons préféré grouper nos recherches non pas dans leur ordre chronologique, mais suivant les différentes étapes de la biosynthèse de l'hème.

I. C'est ainsi que nous avons étudié la biosynthèse de la protoporphyrine globulaire libre. Nous avons accumulé toute une série d'arguments pour montrer que la petite quantité de ce pigment (environ $50 \mu\text{g}/100 \text{ cm}^3$ de globules rouges) que les hématies renferment à l'état libre, ne provient pas de la dégradation de l'hémoglobine, mais qu'elle est au contraire d'origine synthétique.

Nous avons en effet noté :

1. L'augmentation du taux du pigment lors de l'incubation, en présence du glycocolle, du sang périphérique de Lapin, rendu anémique préalablement par saignées répétées ou par administration de phénylhydrazine.

2. Au cours de cette synthèse, nous avons observé l'intervention des mêmes facteurs et dans le même sens que l'ont rapporté RITTENBERG et ses collaborateurs pour la synthèse de l'hémoglobine dans des conditions expérimentales semblables.

3. Au cours de ces mêmes expériences d'incubation, nous avons pu déceler la synthèse des précurseurs tétrapyrroliques de la protoporphyrine, notamment l'uroporphyrine et la coproporphyrine.

4. Dans nos expériences d'incubation, la vitamine B₁₂ et l'acide folique se sont révélés les activateurs puissants de la synthèse de la protoporphyrine. Ce même phénomène a été retrouvé *in vivo*, ce qui nous a permis d'apporter un intéressant argument biologique en faveur de l'origine synthétique de la protoporphyrine libre.

C'est ainsi que chez le Lapin, nous avons épuisé ou tout au moins fortement réduit la réserve en glycocolle — indispensable à la biosynthèse des porphyrines — par injection préalable d'une dose élevée de benzoate de sodium, qui s'élimine dans les urines de cette espèce sous forme de conjugué glycollique (acide hippurique). Chez l'animal ainsi préparé, la vitamine B₁₂ et l'acide folique n'augmentaient pas le taux de la protoporphyrine globulaire libre, mais il suffisait d'administrer avec les deux vitamines une dose de glycocolle pour retrouver une très nette augmentation du taux du pigment.

Les résultats de ces expériences ont été largement confirmés par la suite et utilisés au cours de quelques travaux tout récents sur l'étude enzymatique de la biosynthèse des porphyrines (GRANICK, 1958 ; GRIENSTEIN et collaborateurs, 1959).

II. L'étude des activateurs et des inhibiteurs de la synthèse de la protoporphyrine nous a permis de constater qu'au cours de l'incubation en conditions d'anaérobiose, du sang de Lapin anémique, et additionné de glycocolle, c'est la coproporphyrine qui s'accumule dans le milieu d'incubation sans néoformation de protoporphyrine. Au moment, où nous l'avons établi, ce fait, rapidement confirmé par les auteurs anglo-saxons, a constitué un important argument en faveur de la coproporphyrine comme stade intermédiaire au cours de la biosynthèse de la protoporphyrine.

L'étude des effecteurs de la biosynthèse de la protoporphyrine nous a d'autre part conduits à remarquer une action intéressante du fluorure de sodium. Cet inhibiteur, incubé avec le sang de Lapin, normal ou anémique, a fortement augmenté le taux de la protoporphyrine globulaire libre, alors que lors de l'incubation du sang de Poulet normal, le fluorure de sodium a exercé au contraire une action inhibitrice sur la synthèse du pigment. Mais il ne s'agit pas d'une différence d'espèce (globules nucléés), comme nous l'avons tout d'abord envisagé, puisqu'il suffit de rendre anémique par saignées ou par intoxication phénylhydrazinique le Poulet, pour retrouver avec le sang de Poulet l'effet exercé par le fluorure de sodium chez le Lapin anémique.

Cette action du fluorure de sodium nous a fourni la première indication en faveur de la capacité des globules rouges périphériques du Lapin normal de synthétiser l'hémoglobine. Nous avons en effet retrouvé, lors de l'incubation avec du glycocolle en présence de fluorure de sodium des globules périphériques du Lapin normal, l'accumulation de la protoporphyrine libre dans les hématies.

Nous avons interprété l'action du fluorure de sodium comme une inhibi-

tion de la synthèse de l'hème, entraînant ainsi l'augmentation du taux de la protoporphyrine libre par non-utilisation.

Nos expériences faites avec l'aide du glycolle marqué dans son groupement méthylénique par le ^{14}C ou du fer radioactif (^{59}Fe), ont pleinement confirmé cette hypothèse. Dans les expériences d'incubation du sang périphérique de Lapin anémique ou normal, en présence de fluorure de sodium, l'hème isolé en fin d'incubation était en effet pratiquement dépourvu de radioactivité, alors que la protoporphyrine globulaire libre a montré une radioactivité très significative.

D'autre part nous avons étudié par une méthode directe cette action inhibitrice du fluorure de sodium. Dans ce but, nous avons préparé à partir des globules rouges de Poulet, suivant la technique de GOLDBERG, le système enzymatique qui catalyse l'incorporation du fer dans la protoporphyrine. Lors de l'incubation de cette préparation avec de la protoporphyrine chimiquement pure et du fer radioactif (Fe^{59}), le fluorure de sodium a suspendu la formation de l'hème. Ainsi nous avons pu éclaircir le point d'attaque du fluorure de sodium, situé à l'étape de l'incorporation du fer dans la molécule porphyrinique.

Nous avons pu mettre en évidence une action semblable du plomb et de l'oxyde de carbone. L'effet de ce dernier toxique est toutefois assez complexe. Il agit, en effet, de la même façon que le fluorure de sodium et le plomb lors de l'incubation du sang avec le ^{59}Fe , mais il n'inhibe pas la synthèse de l'hème lorsque le fer et la protoporphyrine sont incubés avec la préparation enzymatique de GOLDBERG.

Ces résultats ont eu une incidence clinique. Les trois toxiques, le fluorure de sodium, le plomb et l'oxyde de carbone, déterminent, en effet, une anémie particulière caractérisée par une hypochromie et une hypersidérémie et une augmentation du taux de la protoporphyrine globulaire libre. Ces caractères s'expliquent par la localisation biochimique de l'action de ces substances toxiques, telle que nos expériences ont permis de l'établir. Le fer et la protoporphyrine libre s'accumulent par inhibition de leur utilisation pour la synthèse de l'hème, le même mécanisme expliquant les caractères hypochromes de l'anémie. Les anémies hypochromes, hypersidérémiques non toxiques, à l'étude actuellement en pathologie humaine, sont probablement déterminées par le même mécanisme biochimique.

III. Nous avons également étudié, la biosynthèse de la protoporphyrine, à partir des différentes intermédiaires.

C'est ainsi que nous avons noté que la plupart des organes de Lapin et de Rat, sont capables de synthétiser la protoporphyrine aussi bien à partir de l'acide δ -aminolévulinique qu'à partir du porphobilinogène. Nous avons noté une intéressante différence d'organes : contrairement au foie, à la rate, à la moelle osseuse et au rein, qui réalisent à partir de ces précurseurs la synthèse de la protoporphyrine, avec le tissu pulmonaire, la synthèse s'arrête pratiquement au stade de l'uroporphyrine.

D'autre part, au cours de nos expériences concernant les activateurs et les inhibiteurs de la biosynthèse porphyrinique à partir de l'acide δ -aminolévulinique et du porphobilinogène, nous avons confirmé l'intervention des sys-

tèmes enzymatiques à nature sulfhydrylique. Nous avons pu montrer également que les deux systèmes enzymatiques, celui qui transforme l'acide δ -aminolévulinique en porphobilinogène et celui qui catalyse la formation de l'uroporphyrine, sont de natures très voisines sans être toutefois identiques.

IV. En étudiant par la méthode des isotopes le système enzymatique qui réalise l'incorporation du fer dans la protoporphyrine pour former l'hème, nous avons mis en évidence cet enzyme dans le sang de Lapin préalablement rendu anémique par administration de phénylhydrazine.

Nos expériences ont montré que la conservation du sang pendant un laps de temps relativement court, diminuait l'activité de l'enzyme. L'adjonction de l'inosine ou de l'adénosine au sang à conserver, s'oppose à la diminution de cette activité enzymatique. La conservation de celle-ci semble donc liée à l'activité glycolytique des globules rouges. FINCH et ses collaborateurs ont en effet montré que l'adjonction de l'inosine et de l'adénosine au sang, prolongeait la conservation de celui-ci, grâce à la néoformation de l'acide adénosine-triphosphorique par le maintien de la glycolyse.

BIBLIOGRAPHIE

- BÉNARD, H., GAJDOS, A. et GAJDOS-TÖRÖK, M. (1950 *a*). L'augmentation du taux de la protoporphyrine libre des érythrocytes chez le Lapin après injections d'acide folique. *C. R. Soc. Biol. Paris*, **144**, 38.
- BÉNARD, H., GAJDOS, A. et GAJDOS-TÖRÖK, M. (1950 *b*). Sur l'origine synthétique de l'hyperprotoporphyrine libre déterminée chez le Lapin par la vitamine B₁₂. *C. R. Soc. Biol. Paris*, **144**, 1488.
- BÉNARD, H., GAJDOS, A. et GAJDOS-TÖRÖK, M. (1951 *a*). Action de certains activateurs et inhibiteurs sur la biosynthèse de la protoporphyrine hémoglobinique par les globules rouges périphériques du Lapin. *C. R. Soc. Biol., Paris*, **145**, 538.
- BÉNARD, H., GAJDOS, A. et GAJDOS-TÖRÖK, M. (1951 *b*). Le dosage de la protoporphyrine libre des globules rouges comme moyen d'études de la synthèse de la protoporphyrine hémoglobinique. *C. R. Soc. Biol. Paris*, **145**, 536.
- BÉNARD, H., GAJDOS, A. et GAJDOS-TÖRÖK, M. (1951 *c*). Évolution de la synthèse de la protoporphyrine libre des globules rouges durant la période de réparation de l'anémie phénylhydrazinique chez le Lapin. *C. R. Soc. Biol. Paris*, **145**, 1617.
- BÉNARD, H., GAJDOS, A. et GAJDOS-TÖRÖK, M. (1952 *a*). Biosynthèse expérimentale des uro-, copro- et protoporphyrines par les globules rouges périphériques du Lapin. *C. R. Soc. Biol., Paris*, **146**, 699.
- BÉNARD, H., GAJDOS, A. et GAJDOS-TÖRÖK, M. (1952 *b*). Action inhibitrice de l'anaérobiose et du fluorure de sodium dans la synthèse de la protoporphyrine par des globules rouges de Lapin. *C. R. Soc. Biol. Paris*, **146**, 701.
- BÉNARD, H., GAJDOS, A. et GAJDOS-TÖRÖK, M. (1953 *a*). Quelques données nouvelles concernant la biochimie normale et pathologique des porphyrines. *Arch. Biol. med. Paris*, **29**, 1.
- BÉNARD, H., GAJDOS, A. et GAJDOS-TÖRÖK, M. (1953 *b*). Action du fluorure de sodium sur la biosynthèse de la protoporphyrine. *C. R. Soc. Biol. Paris*, **147**, 92.
- BÉNARD, H., GAJDOS, A. et GAJDOS-TÖRÖK, M. (1955). Action de certains inhibiteurs et activateurs sur le métabolisme du porphobilinogène *in vitro*. *C. R. Soc. Biol. Paris*, **149**, 312.
- BÉNARD, H., GAJDOS, A. et GAJDOS-TÖRÖK, M. (1957). Biosynthèse de l'hémoglobine par les globules rouges périphériques du lapin normal. *C. R. Soc. Biol. Paris*, **151**, 1115.
- BÉNARD, H., GAJDOS, A. et GAJDOS-TÖRÖK, M. (1958 *a*). Biogénèse de l'hémoglobine par le sang périphérique du Lapin. *Exposés annuels de Biochimie Médicale*, **20**, 41. Éditeurs : Masson et Cie, Paris.
- BÉNARD, H., GAJDOS, A. et GAJDOS-TÖRÖK, M. (1958 *b*). Étude de la biosynthèse de l'hème *in vitro* à l'aide des isotopes radioactifs à partir du sang de Lapin intoxiqué par le plomb. *C. R. Soc. Biol. Paris*, **152**, 296.
- BÉNARD, H., GAJDOS, A. et GAJDOS-TÖRÖK, M. (1958 *c*). Anémie hypochrome, hypersidéroplassmatique du Lapin à la suite d'une intoxication par le fluorure de sodium. Mécanisme pathogénique. *C. R. Soc. Biol. Paris*, **152**, 416.
- BÉNARD, H., GAJDOS, A. et GAJDOS-TÖRÖK, M. (1958 *d*). *Porphyrines. Etude clinique et biologique*. Editeurs Baillière et Fils, Paris.
- BERLIN, N. Y., GRAY, C., NEUBERGER, A. et SCOTT, J. J. (1954). The metabolism of the porphyrin precursor δ -aminolaevulinic acid in normal man and in the rat. *Biochem. J.*, **58**, XXX.
- BOGORAD, L. (1955 *a*). Intermediates in the biosynthesis of porphyrins from porphobilinogen. *Science*, **121**, 878.
- BOGORAD, L. (1955 *b*). Enzymatic synthesis of uroporphyrin. *Fed. Proc.*, **14**, 184.
- BOGORAD, L. (1958). The enzymatic synthesis of porphyrins from porphobilinogen. *J. biol. Chem.*, **233**, 501.
- BOGORAD, L. et GRANICK, S. (1953). The enzymatic synthesis of porphyrins from porphobilinogen. *Proc. nat. Acad. Sci. Wash.* **39**, 1176.
- BOOIJ, H. L. et RIMINGTON, C. (1957). Effect of Pre-heating on Porphyrin Synthesis in Red. Cell. *Biochem. J.*, **65**, 4 P.

- CARTWRIGHT, G. E., HUGULEY, C. M., ASHENBRUCKER, H., FAY, J. et WINTROBE, M. M. (1948). Studies on free erythrocyte protoporphyrin, plasma iron and plasma copper in normal and anemic subjects. *J. Hematol.*, **3**, 501.
- COOKSON, G. H. et RIMINGTON, C. (1953). Porphobilinogen. Chemical Constitution. *Nature Lond.*, **172**, 875.
- DRESEL, E. I. B. (1955). The role of some porphyrins and porphyrin precursors in the biosynthesis of haem. Porphyrin biosynthesis and metabolism. *Ciba Foundation Symposium on porphyrin synthesis and metabolism*. Churchill J. et A., London, p. 72.
- DRESEL, E. I. B. et FALK, J. E. (1953). Conversion of δ -aminolaevulinic acid to porphobilinogen in a tissue system. *Nature Lond.*, **172**, 1185.
- DRESEL, E. I. B. et FALK, J. E. (1954). Studies on the biosynthesis of blood pigment. *Biochem. J.*, **56**, 156.
- DRESEL, E. I. B. et FALK, J. E. (1956). Studies on the biosynthesis of blood pigment. *Biochem. J.*, **63**, 72, 80, 87, 388.
- ERIKSEN, L. (1955). Lead intoxication. The effect of lead on the *in vitro* biosynthesis of haem and free erythrocyte porphyrins. *J. Scand. Lab. clin. Invest.*, **7**, 80.
- FABRE, R. F. et NISHIDA, C. (1957). A new method for hemin isolation. *Biochem. Biophys. Acta*, **26**, 437.
- FALK, J. E. et DRESEL, E. I. B. et RIMINGTON, C. (1956). Porphobilinogen as a porphyrin precursor and interconversion of porphyrins in tissue system. *Nature Lond.*, **172**, 292.
- GABRIO, B. W., FINCH, C. A. et HUENNEKENS, F. M. (1956) Erythrocyte preservation. A topic in molecular biochemistry. *Blood*, **11**, 103.
- GAJDOS-TÖRÖK, M. (1957). Action du fluorure de sodium sur la biosynthèse de l'hémoglobine par les globules rouges de lapin intoxiqué par la phénylhydrazine. *C. R. Soc. Biol. Paris*, **151**, 1113.
- GAJDOS-TÖRÖK, M., BÉNARD, H., COURSAGET, J. et GAJDOS, A. (1952). Utilisation de l'azote lourd dans l'étude de la synthèse *in vitro* des porphyrines et de l'hémoglobine. *C. R. Soc. Biol. Paris*, **146**, 1076.
- GAJDOS-TÖRÖK, M., BÉNARD, H. et GAJDOS, A. Étude de la synthèse enzymatique de l'hème à partir du fer radioactif et de la protoporphyrine. *C. R. Soc. Biol. Paris*, **152**, 1689.
- GAJDOS, A. et GAJDOS-TÖRÖK, M. (1955 a). Synthèse des porphyrines à partir de l'acide δ -aminolévulinique par divers organes de rat. *C. R. Soc. Biol. Paris*, **149**, 1932.
- GAJDOS, A. et GAJDOS-TÖRÖK, M. (1955 b). Action de certains inhibiteurs et activateurs sur l'acide δ -aminolévulinique-déhydrase. *C. R. Soc. Biol. Paris*, **149**, 2138.
- GAJDOS, A. et GAJDOS-TÖRÖK, M. (1955). Metabolism of the porphobilinogen and of the porphyrins in the rabbit. *Ciba Foundation Symposium Porphyrin biosynthesis and metabolism*. Churchill J. et A., London, p. 229.
- GAJDOS, A. et GAJDOS-TÖRÖK, M. (1958). Anémie hypochrome hypersidérémique expérimentale par intoxication saturnine fluorée ou oxycarbonée du Lapin. *Sang*, **29**, 444.
- GAJDOS, A. et GAJDOS-TÖRÖK, M. Anémie hypersidérémique déterminée par administration intraveineuse de fluorure de sodium. *Rev. d'Hémat.* (sous presse).
- GIBSON, K. D. (1955). Some properties of ALA-dehydrase. *Ciba Foundation Symposium on porphyrin synthesis and metabolism*. Churchill, J. et A., London, p. 27.
- GIBSON, K. D., NEUBERGER, A. et SCOTT, J. J. (1954). The enzymatic conversion of δ -aminolaevulinic acid to porphobilinogen. *Biochem. J.*, **58**, XL1.
- GOLDBERG, A. (1953). Effects in rabbits of barbiturates, sedormid and allied substances upon porphyrin metabolism. *IV^e Congrès Soc. int. Hématol.*, Amsterdam.
- GOLDBERG, A. (1958). The enzymatic formation of haem by the incorporation of iron protoporphyrin. Importance of ascorbic acid, ergothionine and glutathion. *Int. Congr. Haematol.*, Roma.
- GOLDBERG, A., ASHENBRUCKER, H., CARTWRIGHT, G. E. et WINTROBE, M. M. (1956). Studies on the biosynthesis of haem *in vitro* by avian erythrocytes. *Blood*, **11**, 821.
- GRANICK, S. (1955). Porphyrin and chlorophyll biosynthesis in chlorella. *Ciba Foundation Symposium on Porphyrin biosynthesis and metabolism*. Churchill, J. et A., London, p. 143.
- GRANICK, S. (1958). Porphyrin biosynthesis in erythrocytes. Formation of aminolaevulinic acid in erythrocytes. *J. biol. Chem.*, **232**, 1101.
- GRANICK, S. et MAUZERALL, D. (1958 a). Porphyrin synthesis in erythrocytes. Enzymes converting δ -aminolaevulinic acid into coproporphyrin. *J. biol. Chem.*, **232**, 1119.
- GRANICK, S. et MAUZERALL, D. (1958 b). Enzymatic formation of protoporphyrin from coproporphyrin III. *Fed. Proc.*, **17**, 233.
- GRINSTEIN, M. (1947). Studies on protoporphyrin. A simple and improved method for the preparation of pure protoporphyrin from hemoglobin. *J. biol. Chem.*, **167**, 515.
- GRINSTEIN, M., KAMEN, M. D. et MOORE, C. V. (1948). Observation on the utilisation of glycine in the biosynthesis of hemoglobin. *J. biol. Chem.*, **174**, 767.

- GRINSTEIN, M. et WINTROBE, M. M. (1948). Spectrophotometrique micromethode for the quantitative determination of the free erythrocyte protoporphyrin. *J. biol. Chem.*, **172**, 455.
- HEICKEL, T., LOCKWOOD, W. H. et RIMINGTON, C. (1958). Formation of non enzymatic haem. *Nature. Lond.*, **182**, 313.
- JANDL, J. H., INMAN, J. K., SIMMONS, R. L. et ALLEN, D. W. (1959). Transfer of iron from serum-ironbinding protein to human reticulocytes. *J. clin. Invest.*, **38**, 161.
- KENNARD, O. (1953). Porphobilinogen. X-ray cristallographic determination of molecular weight. *Nature. Lond.*, **171**, 876.
- KIKUCHI, G., KUMAR, A., TALMAGE, P. et SHEMIN, D. (1958). The enzymatic synthesis of δ -aminolaevulinic acid. *J. biol. Chem.*, **233**, 1214.
- LEMBERG, R. et LEGGE, J. W. (1949). *Hematin compounds and bile pigments*. Interscience publishers, New York, p. 637.
- LOCKWOOD, W. H. et RIMINGTON, C. (1957). Purification of an enzyme converting porphobilinogen into uroporphyrin. *Biochem. J.*, **67**, 8 P.
- MAUZERALL, D. et GRANICK, S. (1958). Porphyrin biosynthesis in erythrocytes. Uroporphyrinogen and its decarboxylation. *J. biol. Chem.*, **232**, 1141.
- MINAKAMI, S., KAGAWA, Y., TANAKA, S., SUGITA, Y. et YONEYAMA, Y. (1958 a). The effects of Fe⁵⁹ incorporation into heme by duc hemolysate. *J. Biochem. Japon*, **45**, 899.
- MINAKAMI, S., YOSHIBA, A., NAKAO, K. et YONAHAMA, Y. (1958 b). The effect of inhibitors on the synthesis of hemoglobin in canine reticulocyte. *J. Biochem. Japon*, **45**, 913.
- MUIR, H. M. S. et NEUBERGER, A. (1950). The biogenesis of porphyrins. *Biochem. J.*, **47**, 97.
- NEUBERGER, A. et SCOTT, J. J. (1954). Aminoaevalinic acid and porphyrin formation. *Biochem. J.*, **58**, XXX.
- PECORA, L., FATI, S. et VECCHIONE, C. (1957). Le comportement des porphyrines dans l'oxy-carbonisme et dans les autres affections. *Sang*, **28**, 339.
- PECORA, L., GAJDOS, A. et GAJDOS-TÖRÖK, M. (1955). Studio dell'azione del piombo sulla sintesi della protoporfirina libera nei globuli rossi periferici di coniglio. *Folia. med.*, **38**, 773.
- PONTEVORIO, L., RITTENBERG, D. et BLOCH, K. (1950). The utilisation of acetate for the synthesis of fatty acids, cholesterol and protoporphyrin. *J. biol. Chem.*, **179**, 839.
- POPJAK, G., GOSSELIN, L. et JUHOTZKY-GORE, I. (1958). Coenzyme requirements in the synthesis of squalene and sterol from mevalonic acid by cell free preparation of rat liver. *Biochem. Journ.*, **68**, 15 P.
- RICHMOND, J. E., SALOMON, K. S. et CAPLIN, S. (1954). Biosynthesis of hemin in soy-bean nodules homogenates. *Nature Lond.*, **174**, 34.
- RIMINGTON, C. (1951). Preliminary investigations for a study of energy utilized for the surviving fawl erythrocytes in heat synthesis. *Ciba Foundation conference on Isotopes in Biochemistry*. Churchill, J. et A., London, p. 86.
- RIMINGTON, C. Communication personnelle.
- RIMINGTON, C., KROLL, S. et TOOTH, B. (1956). Detection and determination of porphobilinogen in urine. *Scand. J. clin. Lab. Invest.*, **8**, 251.
- RISI, A. (1931). Influenza del fluoruro di sodio sulle costanti fisicochimiche del sangue e sullo schema nucleare di Arneth. *Riv. Patol. sper.*, **6**, 312.
- SCHMID, R. et SCHWARTZ, S. (1952). Experimental porphyria. Hepatic type produced by sedormid. *Proc. Soc. exp. Biol. N. Y.*, **81**, 685.
- SCHMID, R. et SHEMIN, D. Cités par SHEMIN RUSSEL et ABRAMSKY.
- SHEMIN, D., ABRAMSKY, F. et RUSSEL, C. S. (1954). The synthesis of protoporphyrin from δ -aminolaevulinic acid in a cell free extract. *J. Amer. chem. Soc.*, **76**, 1204.
- SHEMIN, D. et KUMIN, S. (1952). The mechanism of porphyrin formation of a succinyl intermediate from succinate. *J. biol. Chem.*, **198**, 827.
- SHEMIN, D., LONDON, I. M. et RITTENBERG, D. (1950). The synthesis of protoporphyrin *in vitro* by red blood cells of the duck. *J. biol. Chem.*, **183**, 757.
- SHEMIN, D., LONDON, I. M. et RITTENBERG, D. (1948). The *in vitro* synthesis of heme from glycine by the nucleated blood cells. *J. Biochem.*, **173**, 799.
- SHEMIN, D., LONDON, I. M. et RITTENBERG, D. (1950). The synthesis of protoporphyrin *in vitro* by red blood cells of the duck. *J. biol. Chem.*, **183**, 767.
- SHEMIN, D. et RUSSEL, C. S. (1953). δ -aminolaevulinic acid its role in the biosynthesis of porphyrins and purins. *J. Amer. chem. Soc.*, **75**, 4873.
- SHEMIN, D., RUSSEL, C. S. et ABRAMSKY, F. (1955). The succinate glycine cycle. The mechanism of pyrole synthesis. *J. biol. Chem.*, **215**, 613.
- SHEMIN, D. et SCHMID, R. (1955). The enzymatic formation of porphobilinogen from δ -aminolaevulinic acid and its conversion to protoporphyrin. *J. Amer. chem. Soc.*, **77**, 506.

- SHEMIN, D. et WITTENBERG, J. (1951). The mechanism of porphyrin formation. The role of tricarboxylic acid cycle. *J. biol. Chem.*, **192**, 315.
- THOMAS, J. (1938). Contribution à l'étude des porphyrines en biologie et en pathologie. *Bull. Soc. Chim. biol., Paris*, **20**, 471.
- VALVAJEC, M. (1932). Das Blutbild des Kaninchens bei experimenteller Natrium fluorid-vergiftung. *Z. ges. exp. Med.*, **85**, 382.
- VANNOTTI, A. et DELACHAUX, A. (1942). *Der Eisenstoffwechsel und seine klinische Bedeutung*. Benno Schwabe et Cie, Basel, p. 76.
- WESTALL, R. G. (1952). Isolation of porphobilinogen from the urine of a patient with acute porphyria. *Nature Lond.*, **170**, 614.
- WRISTON, J. C., LACK, L. et SHEMIN, D. (1955). The mechanism of porphyrin formation. *J. biol. Chem.*, **215**, 602.
-

Le Gérant : G. MASSON.

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Physiologie de la respiration à basse et à haute pression.

VU ET APPROUVÉ :

Paris, le 2 octobre 1959.

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

J. PÉRÈS.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

Jean SARRAILH.



Printed in France.